

EXPRESSION DES HEPATITIS B VIRUS
OBERFLÄCHENANTIGENS (HBsAg) IN VITRO DURCH KOLONIERUNG
DES HBsAg GENS

Willy Kurt Roth

*aus
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung für Virusforschung
des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried
bei München

Direktor: Professor Dr. Dr. P.H.Hofschneider

EXPRESSION DES HEPATITIS B VIRUS
OBERFLÄCHENANTIGENS (HBsAg) IN VITRO DURCH KLONIERUNG
DES HBsAg GENS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Willy Kurt Roth
aus Thaleischweiler/Frörschen

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. Dr. P.H. Hofschneider

Mitberichterstatter: Professor Dr. F. Deinhardt

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Januar 1985

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung	
1.1. Hepatitis B Virus	3
1.1.1. Epidemiologie und molekulare Struktur	3
1.1.2. Vakzine	7
1.2. Prinzipielle Verfahren der Gentechnologie	9
1.2.1. Allgemeine Grundsätze	9
1.2.2. Restriktionsenzyme und Ligasen	10
1.2.3. DNA-Vektoren	12
1.2.4. Virale eukaryontische Expressions- vektoren	14
1.3. Problemstellung: Expression Hepatitis B vi- raler Gene in vitro und in vivo	16
2. Materialien und Methoden	
2.1. Materialien	21
2.2. DNA Plasmidisolierung	22
2.2.1. Bakterienkultur	22
2.2.2. Bakterienlyse	22
2.2.3. Plasmidisolierung und Reinigung	23
2.3. Photometrische Bestimmung der DNA Konzen- tration	25
2.4. DNA Gelelektrophorese	25
2.4.1. analytisch	25
2.4.2. präparativ	26
2.5. DNA Restriktionsenzymverdau	26
2.6. DNA Fragmentisolierung durch Elektroelution	27
2.7. Ligation von DNA Fragmenten	28
2.8. DNA Phosphataseverdau	29
2.9. Bakterientransformation	29
2.10. Schnellisolierung von DNA Plasmiden	30
2.11. Zellkultur und Transfektion	31
2.11.1. Vorbereitung der Zellen für die Transfektion	31
2.11.2. Transfektion	32
2.11.3. Weichagarselektion	33

2.11.4. Focusselektion mit Klonierungsringen	34
2.12. Radio Immun Assay	34
3. Ergebnisse	
3.1. Plasmidkonstruktion	35
3.1.1. Kopf-zu-Schwanz Tandemarrangement zweier HBV Genome im Plasmid BR322	35
3.1.2. Integration des HBV BglIII Fragmentes (HBsAg) in das Polyoma Virus Genom des Plasmids PYD3	47
3.1.3. Integration des HBV BamHI Fragmentes (HBsAg) in das Polyoma Virus Genom des Plasmids PYD3	54
3.2. HBsAg Expression in Zellkultur	60
3.2.1. Transiente Expression in den Zell- linien NIH 3T3 Mausfibroblasten und Fisher Rat1 Fibroblasten	60
3.2.2. Permanente Expression nach Cotrans- fektion mit dem Resistenzgenplasmid AG60	62
3.2.3. Permanente Expression in transfor- mierten Zellen	64
4. Diskussion	68
5. Zusammenfassung	79
6. Literaturverzeichnis	82
7. Verzeichnis der Abkürzungen	94
Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Hepatitis B Virus

1.1.1. Epidemiologie und molekulare Struktur

Im Serum von mehr als 200 Mio Menschen ist das Hepatitis B Virus Oberflächen Antigen (HBsAg) zu finden (74, 146). Es ist der wichtigste Marker zum Nachweis einer Infektion durch das Hepatitis B Virus (HBV). Dieses Virus ist der Verursacher der Serumhepatitis, die, im Gegensatz zur A Virus Hepatitis, meist einen schweren und ernsten Krankheitsverlauf nimmt. Bei fulminantem Verlauf kann diese Krankheit zum Tode durch das Leberzerfallsskoma führen. Oft können sich im Spätstadium nach scheinbar überstandener Krankheit, noch eine chronisch aggressive Hepatitis und Leberzirrhose einstellen. In einigen tropischen und fernöstlichen Gebieten der Erde mit hohem Durchseuchungsgrad der Bevölkerung von nahezu 20% (147), korreliert die Häufigkeitsverteilung des Surface Antigens sehr stark mit dem Vorkommen des primären Leberkarzinoms. Diese, in sehr gut fundierten Studien gewonnenen Erkenntnisse (15, 128) werden dadurch bestätigt, daß sich die Prävalenz dieser Tumore parallel zur Verteilung des HBsAg in der übrigen Weltbevölkerung verhält. Sie sinkt über Regionen nur noch geringen Vorkommens (Teilen Süd- und Osteuropas, Mittel- und Fernosts), in denen das HBsAg nur noch in 5% der Bevölkerung zu finden ist, auf fast Null in nordeuropäischen und nordamerikanischen Regionen ab, wo nur noch 0,02-0,1% der Bevölkerung infiziert sind (144, 145, 147).

Diese Daten deuten auch darauf hin, daß den hygienischen Verhältnissen in den einzelnen Ländern in Bezug auf die Prävention der Erkrankung eine nicht geringe Bedeutung zukommt. Ist der Hauptübertragungsweg in den nördlichen Regionen der Erde durch Infusionen und Bluttransfusionen primär iatrogen vermittelt (86, 145), kann im Gegensatz dazu davon ausgegangen werden, daß die Übertragung in den Ländern mit hoher Infektionsrate hauptsächlich über direkten intensiven Kontakt verläuft (120, 129). Für diesen zweiten Übertragungsweg spricht auch, daß das HBsAg nicht nur im Blutserum, sondern auch in

anderen Körperflüssigkeiten und -sekreten infizierter Menschen gefunden wurde (120,129,147).

Neben diesen mehr indirekten Schlußfolgerungen und epidemiologisch gewonnenen Daten über den natürlichen Übertragungsweg, muß die Tatsache, daß das Hepatitis B Virus die Serumhepatitis hervorruft und durch Bluttransfusionen übertragen werden kann, als experimentell gesichert gelten (27, 86, 102). Bisher nicht gelungen ist jedoch der Nachweis einer Hepatitis B Ätiologie des primären Leberkarzinoms, obwohl viele der untersuchten Lebertumore virale Antigene exprimierten und in ihrer Zell-DNA integrierte virale DNA Sequenzen gefunden wurden (13, 17, 33, 54, 65, 107,111,130). Ebenso schlug bisher jedes Bemühen fehl, das Virus in vitro zu züchten. Ein praktikables Tiermodell zur Erforschung des Virus konnte auf Grund der engen Begrenzung des Wirtsspektrums auf den Menschen und höhere Primaten (7) nur durch Ausweichen auf nahe verwandte Hepatitisviren ("Modellviren") in Pekingenten und Erdhörnchen gefunden werden (72,89,114,123,126).

Nachdem es Dane und ihren Mitarbeitern gelungen war, das Virus zu isolieren (27), und später anderen Gruppen die DNA zu klonieren, konnten wichtige molekulare Strukturen des Virus aufgeklärt werden (26,59,103,106,115,117,125,135). Mit einer DNA Länge von nur 3 200 Basenpaaren (bp) und einem Durchmesser von 42 nm, zählt das Virus zu den kleinsten bekannten eukaryontischen Viren. Die DNA kodiert für ein Surface Antigen, das HBsAg, ein Core Antigen, das HBcAg, für eine DNA-abhängige DNA Polymerase und ein Protein X, dessen Funktion nicht bekannt ist. Dabei werden alle drei möglichen Leseraster ausgenutzt. Das HBsAg als Bestandteil der viralen Hülle wird von den infizierten Hepatozyten in hohem Überschuß produziert und kreist als 22 nm Partikel in hohen Titern im menschlichen Blutserum (102). Das HBcAg ist Bestandteil des Nukleocapsids und wird wahrscheinlich durch Proteolyse von dem ebenfalls im Serum, aber in niedrigen Titern zirkulierenden HBeAg abgespalten (3,66).

Den molekularbiologisch interessantesten Befund liefert aber nicht die Genomstruktur, sondern die Struktur der DNA selbst. Wie in Abb.1 dargestellt, erreicht der Minusstrang (der nicht kodierende Strang) die volle Genomlänge des Virus von 3 200bp, der Plusstrang (der kodierende Strang) aber nur 2/3 bis 3/4 dieser Länge (38,59,103,106,123,124,125,126,). Dadurch entsteht eine Lücke von variierender Größe, ein Befund, der bis vor kurzem nicht erklärbar war. Falls neueste Forschungsergebnisse an den o.g. "Modellviren", auf die einige Forschergruppen wegen der Schwierigkeiten bei der Erforschung des humanen Hepatitis B Virus ausgewichen waren, übertragbar sind, können alle bekannten Hepatitis B Viren in eine neuartige Viruskategorie eingeteilt werden. Der Replikationszyklus, der diese Viren von allen bisher bekannten Viren unterscheidet (71,124), ist in Abb.2 schematisch dargestellt. Danach haben sie, obwohl DNA Viren, einen Replikationsmechanismus wie RNA Retroviren, arbeiten also mit reverser Transkription; d.h., RNA dient als Informationsträger und wird in DNA umgeschrieben. Vielleicht ist in diesem Mechanismus auch die Fähigkeit zur Integration in die Wirtszell-DNA und zur malignen Transformation begründet.

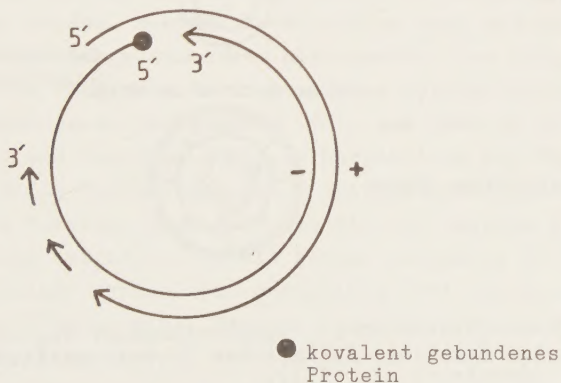


Abb. 1: Genomstruktur von Hepatitis B ähnlichen Viren nach Summers et. al. (124).

Extrazelluläres Virus
mit DNA Polymerase 
und covalent gebundenem Protein ▲



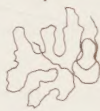
Zelloberfläche

DNA Matrizen für
die Transkription



Penetration

Plus-Strang RNA in
voller Länge: "Pre-Genom"



Transkription

unreifes Core mit
Pre-Genom und DNA
Polymerase



Verpackung

vorübergehendes Core
mit Minus-Strang DNA
in voller Länge

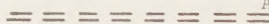


reverse Transkription
der Minus-Strang DNA,
Abbau des Pre-Genoms

Core mit Verpackungs-
signalen



Synthese der Plus-
Strang DNA und Ver-
packungssignale



Capsidbildung und
Ausschleusung

Extrazelluläres Virus



Abb.2: Von Summers et al. vorgeschlagener Weg der Replikation von Hepatitis B ähnlichen Viren, modifiziert nach Summers et al. (124).

1.1.2. Vakzine

So interessant und für die Grundlagenforschung wichtig es ist, die molekulare Struktur und den Transmissions- und Replikationszyklus des HBV zu erforschen, stand bei den Arbeiten auch die Absicht Pate, mit den gewonnenen Kenntnissen einen Schutz des Menschen vor der HBV Infektion zu ermöglichen. Da antivirale Medikamente, ausgenommen Immunglobulin, nicht zur Verfügung stehen, kommen nur präventive Maßnahmen in Betracht. Neben hygienischen und sozialhygienischen Maßnahmen ist für exponierte Personengruppen, aber auch für die besonders betroffenen Länder der Dritten Welt, die Vakzinierung die Methode der Wahl. Trotz aufwendiger und intensiver Forschung sind erst seit kurzem Impfstoffe auf dem Markt (74). Diese müssen aber, mangels Züchtungsmöglichkeit des Virus, aus dem Serum menschlicher HBsAg Träger isoliert werden. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, daß nicht das vollständige Virus zur Immunisierung notwendig ist, sondern das im Überschuß ins Serum sezernierte HBsAg vollends genügt. In aufwendigen Verfahrensabläufen mit vielen Trennungs- und Inaktivierungsschritten wird dieses Protein aus dem Serum von freiwilligen Spendern isoliert. Insgesamt ist dies ein wenig effizientes, aber teures Unterfangen, wobei gerade der wirtschaftliche Aspekt für ärmere Länder negativ zu Buche schlägt. Entsprechend sind auch die Bemühungen, alternative Verfahren zu entwickeln, intensiv vorangetrieben worden. Hierbei konkurrieren zwei grundsätzlich verschiedene Vorgehensweisen miteinander: Zum einen die vollsynthetische chemische Herstellung des Polypeptids HBsAg, oder einer immunogenen Teilsequenz (96), zum anderen die gentechnologische und damit biologische Herstellung des Hüllproteins HBsAg. Beide Verfahren haben große Vorteile gegenüber der bisherigen Methode, besonders was die biologische Sicherheit der Vakzine betrifft. Hiermit können eindeutig definierte Moleküle erzeugt werden, die garantiert frei von infektiösen Hepatitis B Viren sind. Daneben kann die Verunreinigung mit allergisierenden Stoffen auf ein Maß reduziert werden, das bei der Gewinnung aus menschlichem Serum sicherlich nicht erreichbar ist. In Bezug auf die Reinheit des Impfstoffes

dürfte die chemische Synthese wohl die größten Vorteile für sich verbuchen. In Bezug auf die biologische Aktivität, d.h. Immunogenität, sollte die gentechnologische Produktion jedoch überlegen sein, da ein vollkommen natürliches, originäres Produkt gebildet wird. Schließlich ist bei beiden Verfahren die Möglichkeit der großtechnischen Produktion gegeben, was langfristig gegenüber der herkömmlichen Impfstoffherstellung von entscheidendem Vorteil sein dürfte.

Zusätzliche Wege der Immunisierung sind durch gentechnologische Methoden denkbar, die die Impfstoffherstellung nicht in vitro, sondern in vivo ermöglichen könnten. Durch entsprechende Applikation neu arrangierter HBV DNA mit Expressionsvektoren könnte in vivo, im körpereigenen Zellverband, eine genügend hohe HBsAg Produktion erreicht werden, die zur Auslösung einer Immunantwort genügt.

1.2. Prinzipielle Verfahren der Gentechnologie

1.2.1. Allgemeine Grundsätze

Die Gentechnologie hat in den letzten Jahren eine rasante Entwicklung erfahren und ist zu einem bedeutenden Zweig der Molekularbiologie geworden. Hierbei zählen nicht nur die rein technischen Ingenieurleistungen des "genetic engineering", die mehr anwendungsorientiert sind, sondern auch die vollkommen neuen methodischen Zugänge zu Fragen der Grundlagenforschung. Mit diesen Methoden konnten und können molekulare Mechanismen der Genomorganisation und der Genexpression sowohl pro- wie eukaryontischer Organismen entschlüsselt werden, und sie liefern auch die Mittel in eben diese Strukturen verändernd einzugreifen. Hierzu sind lediglich die "Werkzeuge" zu nutzen, mit denen die Natur selbst Eingriffe in, und Veränderungen an der Erbsubstanz vornimmt.

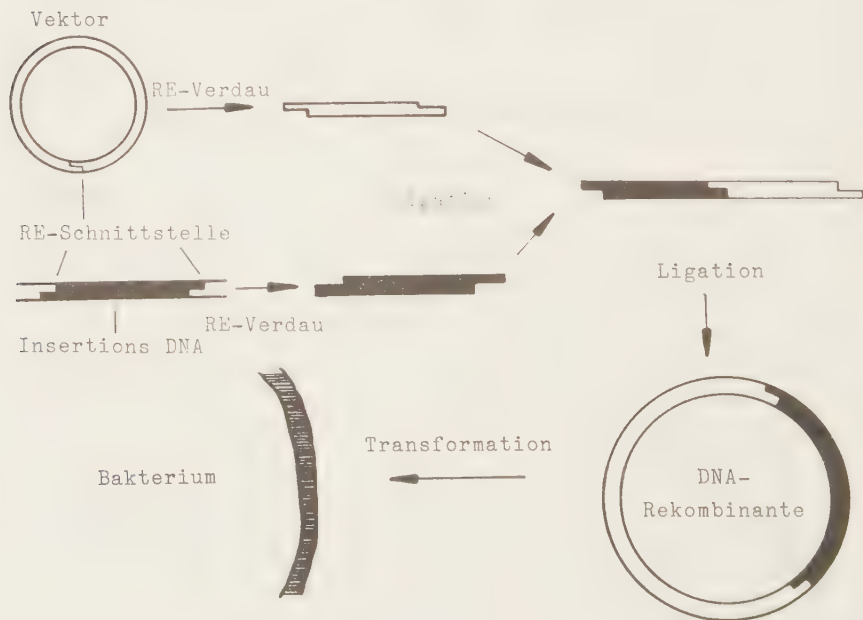
Ein wichtiges Merkmal dieser Techniken der Neukombination der Erbsubstanz, ob DNA oder RNA, ist ihre identische Vermehrung zu handhabbaren Größenordnungen: Das Klonieren. Dadurch ist es möglich, in winzigen Mengen gesammeltes Material nach Neukombination mit sog. Klonierungsvektoren so zu vermehren, daß eindeutig definierte, identische Moleküle in fast beliebigen Mengen zur Verfügung stehen.

In der Natur kommt es bei jeder Phageninfektion von Bakterien, oder Virusinfektion von Zellen, zu solch einer klonalen Vermehrung identischer Virus- bzw. Phagen DNA. Nicht selten wird bei transduzierenden Phagen während des Replikationsvorganges bakterielle DNA ins eigene Genom eingebaut und bei der Infektion in das nächste Bakterium mitgenommen (80). Dies ist das natürliche in vivo Äquivalent für das künstliche Rekombinations- und Klonierungssystem und wird im Prinzip nur in vitro nachgemacht. Ausgewählte Phagen, wie z.B. der Phage λ , die Teile ihres Genoms aufgeben können, ohne Infektiosität und Replikationsfähigkeit zu verlieren, wurden zu künstlichen Klonierungsvektoren, die Passagier- oder Mitfahrer DNA aufnehmen können, umgebaut (62,83,85,99,143). Hiermit werden modifi-

zierte Bakterien, die leicht infiziert werden können und nur unter definierten artefiziellen Bedingungen leben können infiziert und für die Vermehrung der Phagen DNA verwendet (57). Als Passagier DNA kann jede beliebige fremde DNA eingefügt werden, die lediglich in ihrer Länge (Anzahl der Basenpaare), abhängig vom verwendeten Vektor, bestimmten Ober- und Untergrenzen unterworfen ist.

1.2.2. Restriktionsenzyme und Ligasen

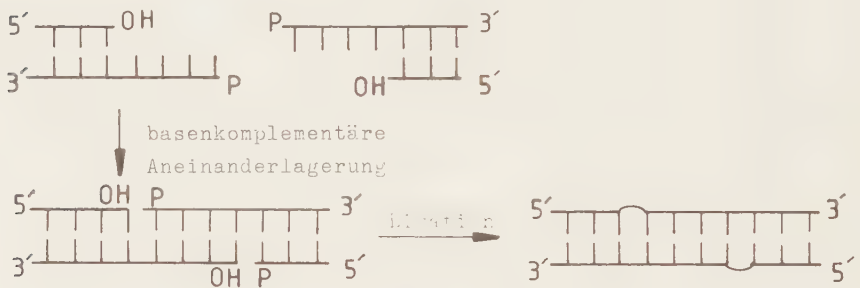
Künstliche DNA Rekombinationen wurden erst mit der Entdeckung von Restriktionsenzymen und Ligasen möglich (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100). Sie bilden mit den Vektor-Wirtssystemen die Grundlagen des "genetic engineering". Durch die Restriktionsenzyme wurde es möglich, die DNA an definierten Stellen in definierte Stücke zu schneiden, und mit den Ligasen wurde es möglich die DNA Stücke, ohne Verlust von biologischer Funktion, wieder neu zusammen zu schweißen. Im folgenden Schema ist dieser Vorgang im Prinzip dargestellt.



Wesentliche Unterscheidungsmerkmale der Restriktionsenzyme (RE), die in Bakterien natürlicherweise vorkommen und aus ihnen isoliert werden, sind die Sequenzen der Schnittstellen und die Schnittführung in der DNA. Die auch als Erkennungssequenz bezeichneten Schnittstellen haben fast ausschließlich Pallindromstruktur, d.h., sie haben durch die Basenkomplementation, vorwärts und rückwärts gelesen, dieselbe Basenabfolge. Als Beispiel diene das RE EcoRI, aus dem Bakterium *Escherichia coli* gewonnen, das die Sequenz GAATTC erkennt. Auf dem komplementären Strang erscheint die Sequenz CTTAAG, die, rückwärts gelesen, dieselbe Basenabfolge ergibt. Neben solchen Sechser-Sequenzen werden auch von vielen Restriktionsenzymen Vierer-Sequenzen erkannt, wie zum Beispiel das RE AluI aus dem Bakterium *Alubacter luteus*, das die Sequenz AGCT, ebenfalls eine Pallindromstruktur, erkennt. Diese unterschiedlich großen Erkennungssequenzen haben zur Folge, daß die Wahrscheinlichkeit, diese Sequenzen auf einer DNA anzutreffen, verschieden groß ist und daher bei einem DNA Verdau unterschiedlich große Stücke erzeugt werden. Dies kann man sich, je nach Absicht, sehr wohl zunutze machen.

Auch in der Schnittführung lassen sich zwei große Gruppen von Restriktionsenzymen unterscheiden: Solche, die überstehende Enden, sog. "sticky-ends" produzieren und solche, die stumpfe Enden, sog. "blunt-ends" produzieren. Von diesen beiden Gruppen eignen sich die sticky-ends produzierenden Restriktionsenzyme, wie leicht ersichtlich ist, besonders gut für DNA Neukombinationen. Durch die Basenkomplementarität der Einzelstrangenden der DNA Fragmente können diese sich unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen relativ stabil aneinander lagern, bevor durch die enzymatische Ligation eine feste kovalente Bindung der Strangenden wieder hergestellt wird. Als Beispiele können wieder die oben genannten Restriktionsenzyme angeführt werden: Das RE EcoRI trennt den DNA Strang in der Sequenz GAATTC zwischen G und A, so daß AATT als überstehendes Ende gebildet wird; das RE AluI trennt den Strang in der Sequenz AGCT zwischen G und C, so daß die stumpfen Enden AG und CT gebildet werden.

Die DNA Ligasen (75) haben in ihrem natürlichen Wirt die Aufgabe, Replikations- und Reparaturvorgänge an der DNA vorzunehmen. Unter entsprechenden Bedingungen vollbringen sie diese Leistungen auch in vitro. Sie sind das Werkzeug zur covalenten Verknüpfung der durch Restriktionsenzyme hergestellten DNA Fragmente. Hierbei wird das 5'Phosphat eines Nukleotidrests mit der 3'OH-Gruppe des Nachbar-Nukleotidrests verknüpft, womit beide DNA Fragmente wieder kovalent in einer Phosphodiesterbindung miteinander verbunden sind. Diese Reaktion wird sowohl bei sticky-end Ligation wie bei blunt-end Ligation durchgeführt (siehe folgende Zeichnung).



1.2.3. DNA Vektoren

Zu Klonierungszwecken geeignete DNA Vektoren sollten folgende Bedingungen erfüllen:

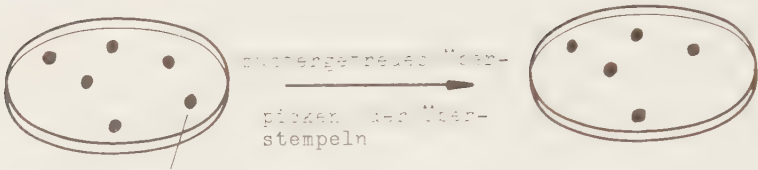
- Sie sollten Passagier DNA aufnehmen können,
- zur selbständigen Replikation, unabhängig vom Genom der Wirtszelle, fähig sein,
- die Selektion derjenigen Vektoren erlauben, die Passagier DNA aufgenommen haben
- und mit hoher Effizienz in die Wirtszelle eingeführt werden können.

Neben den schon erwähnten Bakteriophagen erfüllen diese Forderungen auch bakterielle Plasmide und eukaryontische Viren. Während Viren ihre Wirtszellen, ähnlich wie Phagen ihre Wirtsbakterien, aktiv infizieren können, müssen Plasmide, als "nackte" DNA, mit speziellen Techniken in ihre Wirte eingeschleust werden. Seit den berühmten Versuchen von Avery und Mitarbeitern (5) ist bekannt, daß DNA von Bakterium zu Bakterium weitergegeben werden kann und das Empfängerbakterium dadurch in seinen Eigenschaften verändert wird. Dieser ganze Vorgang, als Transformation bezeichnet, ist im Prinzip ein seltenes Ereignis. Er kann aber bei Inkubation mit bestimmten Metallionen, meist Ca^{++} , und Einhaltung gewisser "Kochvorschriften" um einige Größenordnungen verbessert werden. Der gleiche Transformationsvorgang, mit eukaryontischen Zellen vollzogen, wird heute als Transfektion bezeichnet (139).

Wenngleich auch ohne Selektionsmöglichkeit für Passagier DNA tragende Vektoren, Fremd DNA positive Klone durch Hybridisierungsverfahren auffindbar sind, bietet die Vektor vermittelte Selektion der klonierten DNA doch große Vorteile in Bezug auf die Einfachheit der Handhabung und den Zeitgewinn. Werden Plasmide als Vektoren benutzt (16,19,21,79), kann über den Verlust von Antibiotikaresistenzen selektioniert werden. Im Normalfall sind zwei verschiedene Resistenzgene voll ausreichend für die Klonierungszwecke. Bakterien, die durch Transformation einen Plasmidvektor aufgenommen haben, sind durch Kultivierung in Gegenwart eines Antibiotikums, für das sie ohne Plasmid sensitiv sind, von untransformierten "leeren" Bakterien leicht zu selektionieren. Durch Einbau des Passagier Fragments in eines der beiden Resistenzgene wird das Resistenzgen zerstört und die Bakterien können nicht mehr in Gegenwart des Antibiotikums wachsen, vor dem dieses Gen sie normalerweise schützt. Bakterien, die Vektoren ohne Fremd DNA tragen, wachsen aber auf Grund des intakten Resistenzgens weiter in Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums. Dadurch ist eine Selektion nach der nachfolgend skizzierten Methode möglich.

Originalplatte mit z.B.
Ampicillin

Referenzplatte mit z.B.
Ampicillin und Tetracyclin



gesuchter Klon, der rekombiniertes Vektorplasmid mit nur noch einer Antibiotikaresistenz trägt

Klone, die nur Vektorplasmid mit beiden Resistenzen tragen

Anders verhält es sich dagegen bei Bakteriophagen bzw. Viren. Hier wird die Tatsache ausgenutzt, daß infektiöse Phagen bzw. Viren nur gebildet werden können, wenn die DNA eine bestimmte Länge nicht unter- oder überschreitet. Wird die Länge der Vektor DNA nun so gewählt, daß sie zu kurz für eine Verpackung in die Phagenhülle bzw. das Viruscapsid ist, kann nur dann Infektion des Wirts und damit Vermehrung im Wirt erfolgen, wenn die fehlende DNA durch Passagier DNA ersetzt wird. Erfolgreich infizierte Wirte implizieren damit erfolgreiche DNA Neukombinationen.

1.2.4. Virale eukaryontische Expressionsvektoren

Generell haben Expressionsvektoren die Aufgabe, in einem artfiziellen Wirtssystem (Zellkulturen, Hefen, Bakterien)

- die Einschleusung von Fremd DNA zu ermöglichen oder zu begünstigen,
- die Expression des Fremdgens zu ermöglichen oder zu ver-

stärken,

- die Expression als permanente Expression zu etablieren und
- die Selektion der Fremdgen exprimierenden Zellen, Hefen, Bakterien zu erlauben.

Als Vektoren können in Bakterien Plasmid- oder Phagen DNA zur Verwendung kommen, in Hefen und in Zellen entsprechend arrangerierte eukaryontische Resistenz- und Selektionsgene (23,63,69, 88,94,140-142) oder virale DNA (29,30,37,39,40,45-47,49-52,77, 82,92,105,116,121,127,133,136)! Als virale Expressionsvektoren eignen sich besonders die Tumorigene SV40, Polyoma (29,136), Papilloma (105) und MSV (30,121), die in mehrfacher Hinsicht, je nach Zweck, eingesetzt werden können. Werden z.B. bestimmte Sequenzen einer Virus DNA deletiert und stattdessen ein fremdes Gen entsprechender Größe eingesetzt, kann durch Cotransfer mit einer sog. Helfervirus DNA (DNA des gleichen Virus, an anderer funktioneller Stelle deletiert und daher allein unter bestimmten Bedingungen ebenfalls nicht zur Virusbildung fähig) gegenseitig Komplementation erfolgen. In einer hiermit infizierten permissiven Zellkultur kann Virusreplikation stattfinden und das in die DNA eingebrachte Fremdgen exprimiert werden. Solche oder ähnliche Systeme wurden sowohl mit Polyoma (29), als auch mit SV40 (37,39,40,45,46,49-52,77, 82, 113,127,133) und Vaccinia Virus (92,116) etabliert, wobei durch große Kopienzahl in der Regel hohe Expressionsraten erzielt wurden. Da aber die Wirtszellen bei der Virusreplikation z.T. lysiert, bzw. bei der Virusgewinnung zerstört werden, müssen immer wieder neue Zellen infiziert werden. DNA Tumorigene bieten demgegenüber noch eine zusätzliche Möglichkeit, Zellen zur Expression fremder Gene zu veranlassen. Wird das zu exprimierende Gen so in die Virus DNA eingebaut, daß die transformierenden Eigenschaften (Gene) des Vektors erhalten bleiben, kann durch Transfektion der entsprechenden semipermissiven Zellkultur eine Integration des DNA Hybrids in das Genom einiger Wirtszellen erreicht werden. Als Folge werden nicht nur die Tumorigene des Vektors exprimiert, sondern meist auch das mitgeschleppte Fremdgen. Die Tumorigene ihrerseits bewirken in der Wirtszelle eine maligne Transformation mit Veränderungen der Morphologie, der Stoffwechsel-

leistungen und des Wachstumsverhaltens, Eigenschaften, die als Selektionsmarker dienen können und die Klonierung transformierter, Fremdgen exprimierender Zellen ermöglichen. Da der transformierte Status der klonierten Zellen stabil ist und durch permanente Expression viraler Tumorseproteine aufrecht erhalten wird, können Zelllinien etabliert werden, die das mitgeführte Gen permanent und stabil exprimieren. Dieses System (30,39,50,52,113,133) bietet, im Gegensatz zum oben beschriebenen lytischen System, den Vorteil, daß die in den Vektor eingesetzte Fremd DNA die Größe der deletierbaren viralen Gene überschreiten kann, da die Verpackung in ein Capsid entfällt.

Nicht jeder beliebige Einbau einer kodierenden Sequenz in einen Vektor führt im entsprechenden Wirtssystem zur Genexpression. Nur wenn alle für die Regulation der Expression notwendigen Kontrollsignale und -sequenzen neben der kodierenden Sequenz mit ihren Introns (2) vorhanden sind, besteht die Chance, das Gen zur Expression zu bringen. Kann ein Gen nicht mit diesen Funktionen als funktionelle Einheit transferiert werden, muß bei der Integration in den Vektor darauf geachtet werden, daß diese Aufgaben von vektoreigenen Sequenzen übernommen werden können. Hierzu müssen, nach heutigem Wissen Enhancer Sequenzen (6,9,44,48,136), Promotoren (TATA-Box) (41, 73,122), Cap-site (61), ribosomale Bindungsstelle und Splicing-signale (12,50,109) vor den kodierenden Sequenzen gelegen sein, und Polyadenylierungssignale (10,50,97) hinter den kodierenden Sequenzen gelegen sein (10,47,50). Hinzu kommt, als weitere essentielle Voraussetzung einer effizienten Expression, das dem Vektor adäquate Wirtszellsystem: Permissive Wirtszellen für lytische Infektion mit Virusreplikation, semipermissive Wirtszellen für eine maligne Transformation der Zelle.

1.3. Problemstellung: Expression Hepatitis B viraler Gene in vitro und in vivo

Mit den Versuchen, HBV Gene zur Expression zu bringen, lassen sich verschiedene Forschungsziele verfolgen. Führend sind zur Zeit die ungelösten Fragen der Virusreplikation und der ver-

muteten Tumorigenität sowie, schon mehr zur Nutzenanwendung, die gentechnologische Impfstoffherstellung.

Die Expression Hepatitis B viraler Gene ist bisher in Bakterien (14,84,119), Hefen (76,134) und diversen permanenten Zelllinien (18,31,77,95,126,137) gelungen. Hierzu wurden in der Regel verschiedene pro- und eukaryontische Vektoren verwendet. Aber auch klonierte DNA alleine, sofern die Integrität ihrer Gene erhalten ist, ist in der Lage, virale Proteine zu exprimieren (18,31,95,137). Vor allem das HBsAg, als Bestandteil des Capsids, wird in Zell- und Hefekulturen, abhängig von den verwendeten Vektoren, sehr gut exprimiert (18,76,77,121,134). Die Expression des Core-Antigens ist jedoch sehr schwierig zu erreichen und nur in Bakterien und, in geringem Maße, bei Hintereinanderschaltung mehrerer HBV Genome in Kopf-zu-Schwanz Anordnung, in Zellkulturen gelungen (14,42,84,119).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden mit dieser Arbeit sowohl Untersuchungen zur Virusreplikation und Tumorigenität, als auch Untersuchungen zu einer gentechnologischen Impfstoffherstellung angestrebt.

Soll eine Virusreplikation in vitro versucht werden, ist die Expression möglichst aller viralen Gene anzustreben, da anzunehmen ist, daß auf einem so kleinen Genom wie das des HBV kaum Platz für überflüssige Information sein dürfte. Ferner ist, als weitere Grundvoraussetzung, ein dem natürlichen Wirt des Virus - humane Hepatozyten - möglichst nahe kommendes in vitro System notwendig. Nur mit einer HBV Kopf-zu-Schwanz Tandemformation von 4 HBV Genomen ist es bisher gelungen, außer HBsAg noch andere HBV Antigene (HBc- und HBeAg) zu exprimieren, ohne aber Viruspartikel selbst nachzuweisen. Hierzu genügten Maus- und Rattenfibroblastenkulturen als Expressionssystem. Eine bessere Expression und damit vielleicht Virusreplikation könnte evtl., bei ähnlicher DNA-Konstruktion, in humanen Hepatozytenkulturen möglich sein. Ein experimenteller Weg, der mit der Arbeit beschritten werden soll.

Untersuchungen zur Tumorigenität des Virus wurden bisher

hauptsächlich durch molekularbiologische Charakterisierung von HBV DNA-Sequenzen in primären Leberzellkarzinomen geleitet. Das ist ein vielversprechender, bisher aber nicht sehr erfolgreicher Ansatz, sieht man einmal von den Ergebnissen von Summers et al. (124), das Pekingenten Hepatitis Virus betreffend, ab. Da die bisher untersuchten primären Leberzellkarzinome mit integrierter HBV DNA keine anderen HBV Gene exprimierten außer HBsAg, könnte man annehmen, daß zur Induktion eines Tumors durch HBV das nachweislich nicht tumorigene HBsAg bedeutungslos ist und bisher noch unbekannte Gene, z.B. Protein X oder DNA bzw. RNA abhängige DNA Polymerasen (s. Woodchuck Hepatitis Virus) exprimiert werden müssen. Bei entsprechendem experimentellem Design könnte für solche Untersuchungen ein HBV Tandemplasmid ebenfalls gute Dienste leisten. Hierbei muß versucht werden mit HBV DNA in Wirtszellen unter speziellen Bedingungen Tumore zu induzieren, oder zumindest eine gewisse integrative Potenz nachzuweisen. Es ist schließlich durchaus möglich, daß die in primären Leberzellkarzinomen gefundenen HBV Sequenzen nicht ursächlich über virale Genexpression die Transformation bewirkt haben, sondern nur zufällig die Transformation ausgelöst haben (Aktivierung zellulärer Oncogene), oder ohne Beziehung zur Tumorgenese in Tumorzellen zufällig integriert wurden.

Für die gentechnologische Impfstoffherstellung sind mehrere Wege beschreitbar, die zum Teil schon unter Nr. 1.1.2. beschrieben wurden. In erster Linie kommt die in vitro Produktion des immunogenen Antigens, des HBsAg, in Frage, wobei sowohl Bakterien, als auch Hefen und Säugetierzellen verwendet werden können. Bis jetzt haben sich aber nur Hefen und Säugetierzellen als ergiebig genug erwiesen, um für eine gentechnologische Gewinnung des Impfstoffes in Frage zu kommen. Entscheidende Bedeutung kommt hierbei der Wahl des richtigen Expressionsvektors zu, womit die Expressionsrate um Zehnerpotenzen verbessert werden kann (18,121,138). Die Expressionssysteme (Vektoren und Wirtszellen) können, wie unter Nr. 1.2.4. beschrieben, bei entsprechender DNA-Konstruktion beliebig gewählt werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll

die DNA des Polyoma Virus als Vektor benutzt und mit verschieden großen HBV-Sequenzen, die für das HBsAg kodieren, kombiniert werden. Hierbei werden die späten- oder Capsidproteine des Polyoma Virus zerstört, was eine Virusreplikation unmöglich macht (43,118). Die frühen- oder Tumorphosphoproteine bleiben erhalten, wodurch die Transformation der entsprechenden Wirtszellen - Maus- und Rattenfibroblasten (100) -, bei gleichzeitiger HBsAg Expression möglich wird. Die Expressionsraten sollen mit denen von anderen Vektoren verglichen werden.

Die gewählten DNA Konstruktionen, besonders aber der Vektor, scheinen gut geeignet neben der in vitro Expression auch die in vivo Expression des HBsAg anzustreben. Zu diesem Zweck stehen Maus, Ratte und Hamster als Tiermodelle zur Verfügung. In der Maus als permissivem Tier für das Polyoma Virus sollte es zur transienten Expression, oder bei entsprechender DNA-Konstruktion in Verbindung mit einem zu konstruierenden Helfervirus, zu einer lytischen Virusinfektion kommen, wobei ebenfalls HBsAg exprimiert wird. In Hamster und Ratte als semipermissiven Tieren sollte es zur Induktion von Tumoren (100,131) kommen, aus denen permanent HBsAg exprimiert wird. All dies aber nur, wenn die Einschleusung der DNA in das Tier mit genügender Effizienz gelingt. Gerade die Tumorinduktion in semipermissiven Tieren könnte als Nachweis für die qualitative Funktionsfähigkeit der Methode dienen, da zur Tumorinduktion theoretisch eine einzige transformierte Zelle genügt. Die lytische Virusinfektion im Virus-Helfervirus Modell ist noch sensitiver (theoretisch genügt ein DNA Molekül, um eine Virusvermehrung zu starten), ist aber ebenfalls wie die Transformation in Ratte oder Hamster zur humanen Anwendung nicht geeignet und nur als qualitativer Versuch zur prinzipiellen Möglichkeit einer in vivo Immunisierung durch DNA gedacht. Mit der Klonierung des HBsAg Gens im Vaccinia Virus wurde zwar ein solcher Weg eingeschlagen, er bietet aber keine entscheidenden Vorteile, außer vielleicht ökonomischen, gegenüber der HBsAg Produktion in Zell- oder He fekulturen. Eine in vivo Immunisierung mit klonierter DNA dagegen wäre nur sinnvoll anzustreben, wenn erstens die DNA

mit hoher Effizienz in die Zellen eindringen könnte, es zweitens nur im Zytoplasma zur Replikation und transienter Expression käme, sowie drittens keine Integration in die Wirtszell-DNA stattfinden würde und viertens die DNA im Zytoplasma selbst oder durch Absterben der Zelle, wie bei jeder Lebendvakzinierung, abgebaut würde. Ein solches Konzept wird mit der Wahl des Vektors im passenden Tiermodell und der Konstruktion der DNA angestrebt, wobei entsprechende in vitro Expressionsversuche vorausgehen müssen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

Plasmide: pAO1-HBV (Cummings (26)) wurde mir von Frau Schäfer-Ridder überlassen, pPYD3 stellte Charles Weissman, Zürich, zur Verfügung

Restriktionsenzyme: Die jeweils benötigten Enzyme wurden von Boehringer Mannheim oder BRL Biolabs bezogen

T4 DNA-Ligase: Bezugsquelle Boehringer Mannheim

Alkalische Phosphatase: Bezugsquelle Boehringer Mannheim

Lysozym: Bezugsquelle SIGMA Heidelberg

Ampicillin, Tetrazyclin, Chloramphenicol wurden ebenfalls von SIGMA Heidelberg bezogen. Ampicillin und Tetrazyclin wurden als Stocklösung von 100 mg/ml in H_2O bidest., Chloramphenicol als Stocklösung von 120 mg/ml in Äthylalkohol aufbewahrt.

Chemikalien: Alle Chemikalien für Pufferlösungen in enzymatischen Reaktionen sowie in präparativen und analytischen Systemen waren von analytischer Reinheit.

CsCl: Zum Einsatz kam Baker Analysed, Baker DNA Grade, sowie nach Gebrauch wieder aufgearbeitetes CsCl.

Nährmedium für Zellkulturen: Zur Kultivierung der Zellen wurde DMEM der Biochrom KG Berlin, vormals Seromed München, benutzt, dem je nach Verwendungszweck Glucose, Hepes und fötales Kälberserum der Fa Boehringer Mannheim zugesetzt wurde.

Zellen: NIH 3T3 Mausfibroblasten, aus dem Labor von Robert Gallo, New York, stammend, wurden von Frau Wang Yuan und Frau Schäfer-Ridder zur Verfügung gestellt. Fisher Rat 1 Fibroblasten von American cell type culture erhielt ich von Herrn Urs Hänggi, LMU München.

Bakterien: E. coli K12 HB101 wurden mir von Herrn Stratowa und E. coli GM33 dam- von Herrn Kamp überlassen.

Nährmedium für Bakterien: Trypton, Hefeextrakt und Agar wurden von der Fa. Difco bezogen. Für Luria-Broth (LB) Medium

wurden 10g Trypton, 10g Hefeextrakt und 5g NaCl, für Agarplatten zusätzlich mit 14g Agar, in 1l demineralisiertem Wasser gelöst und autoklaviert.

2.2. DNA-Plasmid-Isolierung

(modifiziert nach D.B. Clewell und D.R. Helinski (20))

2.2.1. Bakterienkultur

Alle Gefäße und Geräte, die direkt mit Bakterien in Berührung kamen, wurden 30 min bei 120°C unter gesättigtem Wasserdampf sterilisiert. Die Kulturmedien (Luria-Broth) wurden sterilisiert bevor das Antibiotikum, dem Resistenzfaktor des Plasmids entsprechend, zugegeben wurde. Die Antibiotikakonzentration betrug für Ampicillin 100 mg/l, für Tetrazyclin und Kanamycin je 20 mg/l. Für die Massenkultur wurde zuerst 1 ml Glycerinkultur (0,5 ml Glycerin + 0,5 ml Bakteriensuspension in Luria-Broth-Medium zur Lagerung bei -20°C) in 100 ml frisches, mit Antibiotikum versetztes Luria-Broth-Medium gegeben und darin über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Von dieser Über-Nacht-Kultur wurden 10 ml/l in das Medium (Luria-Broth + Antibiotikum) für die Massenkultur überimpft. Hierin wurden die Bakterien so lange bei 37°C schüttelnd inkubiert, bis sie, gemessen bei 650 nm, eine optische Dichte von 0,8 erreicht hatten. Durch Zugabe von 120 mg/l Chloramphenicol wurde die Vermehrung der Bakterien beendet und die Amplifizierung des Plasmids eingeleitet. Nach weiterer Inkubation von 30-40 Stunden wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und anschließend lysiert.

2.2.2. Bakterienlyse

(A. Colman, M.J. Byers, S.B. Primrose (24))

Die unter 10°C abgekühlte Kultur wurde in 250 ml oder 500 ml Zentrifugenbecher gefüllt und in einer Sorvall Zentrifuge im Rotor GSA oder GS3 7 min bei 4°C und 5000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in einem Becher auf Eis gepoolt und in 100-200 ml kaltem TE Puffer (20 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Danach wurde wieder wie oben zentrifugiert, der Pufferüber-

stand verworfen und das Pellet in (bezogen auf 1 l Kultur) 9 ml 25% Sucrose, 2 mM MgCl₂ gelöst (ca. 5 min auf Eis). Zu dieser Suspension wurde nun 15 mg Lysozym- in 1,8 ml 50 mM Tris, pH 8,0 gelöst- zugegeben und unter sanftem Schütteln 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 3,6 ml 40 mM EDTA wurde die Reaktion nach 5 min bei 0°C gestoppt. Die Lyse der Bakterien setzte mit der Zugabe von 14,4 ml "Lysis Mix" (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 0,5% Triton X-100) ein und dauerte ca. 20 min, während dessen das Lysat, bei Kühlung auf Eis, gelegentlich sanft geschüttelt wurde.

2.2.3. Plasmid Isolierung und Reinigung (R. Radloff, W. Baeur, J. Vinograd (98))

Das durchsichtig klare, zähflüssige Lysat (gute Lyse) wurde in sterile Polycarbonat Röhrchen mit je 35 ml Vol. eingefüllt und, nach Austarieren, in einer Beckmann Zentrifuge im Rotor Ti 60 oder Ti 50.2 bei 4°C und 40 000 bzw. 35 000 UpM 90 min zentrifugiert. Der dünnflüssige, wasserklare Überstand (=geklärtes Lysat) wurde vorsichtig dekantiert und in einem sterilen Meßzylinder gepoolt. Das geklärte Lysat wurde mit einer ein zwanzigstel seines Volumens entsprechenden Menge Ethidumbromid (10 mg/l H₂O) versetzt und in einen sterilen Erlenmeyerkolben umgefüllt. Dem neuen Volumen wurde je ml 1 g Cäsiumchlorid (CsCl)₂ zugegeben. Sobald das CsCl vollständig gelöst war, wurde mit Hilfe eines Refraktometers der Brechungsindex gemessen und durch Zugabe von CsCl oder TE Puffer auf einen Wert von 1,392-1,396 eingestellt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (60 min bei 15°C und 18 000 UpM im SS 34 Rotor) in einer Sorvall Zentrifuge wurde der Hauptteil der bakteriellen Proteine, als dünne Schicht auf dem geklärten Lysat schwimmend, abgetrennt. Nach Umfüllen in verschraubbare Nitrozellulose- oder Polycarbonat Röhrchen und sorgfältigem Austarieren, wurde in einer Beckman Ultrazentrifuge der Lauf einer Gleichgewichtsdichtegradientenzentrifugation gestartet. Im Rotor Ti 60 oder Ti 50.2 (Schraubröhrchen) wurde bei 45 000 UpM und 17°C 48 Std zentrifugiert, im Rotor VTi 50 (verschweißbare Röhrchen) wurde bei 50 000 UpM und 17°C 18 Std zentrifugiert. Nach beendetem

Lauf und vorsichtiger Entnahme der Röhrchen aus dem Rotor, wurde unter UV-Licht von 360 nm Wellenlänge die untere der beiden hell leuchtenden Banden, die die Plasmid-DNA enthielt, seitlich mit einer Spritze abgezapft. Gelegentlich wurde auch, um eine größere Reinheit und höhere Ausbeute zu erzielen, vor dem Zapfen der Plasmid-DNA Bande die darüberliegende Bande aus chromosomaler DNA gezapft und verworfen, oder der Boden der Zentrifugenröhrchen mit einer Injektionsnadel eingestochen und durch vorsichtige Luftzugabe von oben die Plasmidbande tropfenweise gesammelt. Durch dreimaliges Ausschütteln der Plasmidfraktion in sterilen Schraubröhrchen mit wasser-gesättigtem n-Butanol gleichen Volumens wurde das Ethidiumbromid aus der wässrigen Phase extrahiert, in die Butanol-Phase überführt und mit ihr verworfen. Die schließlich klare wässrige Phase wurde gegen 3-5 l TE-Puffer (20 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0) 10-24 Std bei 8°C dialysiert, um CsCl und Butanol weitgehend zu entfernen. Restliche Enzymaktivitäten und Verunreinigungen wurden danach durch dreimalige Phenolextraktion beseitigt. Hierzu dienten Christ Zentrifugationsröhrchen mit spitzzulaufendem Boden, die zur Hälfte mit der dialysierten Plasmidfraktion und zur anderen Hälfte mit wasser-gesättigtem, auf pH 7,5 eingestelltem Phenol gefüllt wurden. Nach Aufsetzen eines Plastikstopfens und vorsichtigem Kippen der Röhrchen während ca. 5 min wurde zentrifugiert und die wässrige Phase in frisches Phenol überführt. Das benutzte Phenol wurde mit frischem TE-Puffer (20 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0), wie vorher beschrieben, erneut geschüttelt, um möglichst wenig Plasmid DNA im Phenol zu verlieren. Dieser gesamte Vorgang wiederholte sich dreimal und am Ende wurden die Plasmidfraktion und der nachgeführte TE-Puffer vereinigt. Mit Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 wurde dreimal ausgeschüttelt, um das Phenol, gemeinsam mit den chloroformlöslichen Stoffen, wieder weitgehend zu entfernen. Diese nun sehr reine Plasmidpräparation wurde mit der 1/10 des Eigenvolumens entsprechenden Menge kaltem, absolutem Äthylalkohol p.a. während 2 Std bei -70°C oder über Nacht bei -20°C aus der wässrigen Lösung ausgefällt. Das weiße Präzipitat konnte dann in einer Sorvall Zentrifuge im HBV swing-out Rotor 30 min bei -10°C und 11 000 UpM abzentrifugiert werden. Nach Dekantieren des

Überstandes und ca. 20 minütiger Trocknung des Pellets unter Vakuum (ohne es ganz trocken werden zu lassen), war die Plasmid-DNA in wenig TE-Puffer (20 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5) sehr gut zu lösen. In der Regel wurde die Plasmid-DNA in diesem Puffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und bei 4°C oder -20°C aufbewahrt.

2.3. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration (91)

Gemessen wurde mit Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke und 1 ml Fassungsvermögen in Zeiß- und Beckman Geräten. In der Regel wurde die Probe 1:100 verdünnt und bei Wellenlängen von 250-290 nm gemessen. Die Konzentration errechnete sich mit dem Umrechnungsfaktor $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g DNA/ml}$, wobei die OD_{260} ungefähr das 2-fache der OD_{280} betragen sollte.

2.4. DNA Gelelektrophorese

(C. Aaij, P. Borst (1,112))

2.4.1. analytisch

Für analytische Zwecke wurde Serva Agarose mit hoher EEO verwendet. 0,8-1%ig (0,8-1 g/100 ml Puffer) in Loening Puffer (36 mM Tris, 30 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mM EDTA, pH 7,8) bis zum Schmelzen erhitzt, wurde die Agarose, nach Abkühlen auf ca. 60°C, zur Verwendung als Horizontalgel auf Glasplatten unterschiedlicher Größe gegossen. Die Glasplatten wurden nach sorgfältiger Reinigung mit einem Klebeband an den Rändern so umklebt, daß mindestens 0,5-1 cm des Bandes nach oben frei überstand, während der Rest nach unten eingeschlagen und fest angedrückt wurde. Mit wenig Agarose wurde das den Gießrahmen bildende Band mit der Glasplatte versiegelt, bevor die restliche Agarose bis zur gewünschten Höhe von 0,2-0,5 cm eingegossen wurde. Zur Aussparung der Auftragschlitze wurde, einige cm vom Plattenrand entfernt, ein Kamm aufgesetzt, der mit Zacken von der gewünschten Größe in die Agarose eintauchte. Nach Erstarren der Agarose wurden Kamm und Klebeband entfernt und das Gel mitsamt Glasplatte in die Elektrophoresekammer gelegt. Dabei war das Gel vollständig von Loening Puffer bedeckt und so orientiert, daß die DNA von den Auf-

tragsschlitzten durch die große Fläche des Gels vom negativen zum positiven Pol wandern konnte. Je Schlitz wurden 100-500 ng DNA, in Volumina von 5-30 µl gelöst, aufgetragen. Den Auftragsvolumina waren als Farbstoffmarker je 2 mg/ml Bromphenolblau, Orange G und Xylencyanol beigegeben. Weiter waren zum Verhindern etwaiger Enzymaktivitäten und zur Erleichterung des Auftrags 6% Sucrose, 2 mM EDTA und 0,6 M Harnstoff enthalten. Bei 100-150 V liefen die Gele zwischen 40 min (Minigele 4x7 cm) und 3 Std; bei 20 V liefen die Gele über Nacht. Zur Sichtbarmachung der DNA wurden die Gele mit 1 µg Ethidiumbromid pro ml H₂O 15-30 min gefärbt und anschließend in H₂O 15 min entfärbt. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht von 360 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und konnten durch einen Rotfilter fotografiert werden. Die Standardbelichtung auf Poaroidfilm E 422 dauerte 7 sec bei Blende 5,6 und 30 cm Abstand.

2.4.2. präparativ

Für präparative Zwecke wurde Seakem Agarose Seaplaque mit hoher EEO, 0,8-1%ig in Tris Acetat Puffer (50 mM Tris, 20 mM Na-Acetat x 3H₂O, 2 mM EDTA), ebenfalls als Horizontalgele gegossen, verwendet. Aufgetragen wurden bis zu 5 µg DNA in 40-80 µl je Schlitz. Im übrigen galten die Anordnungen und Bedingungen wie unter Nr. 2.4.1. bereits genannt.

2.5. DNA-Restriktionsenzymverdau

Die Reaktionspuffer für die verschiedenen Restriktionsenzyme (10 mM Tris pH 7,5, 6 mM MgCl₂, 0-150 mM NaCl, 6 mM Mercapto-äthanol, 200 µg/ml Gelatine), die sich nur in der NaCl Konzentration (0,10, 20, 100, 150 mM) unterschieden, wurden als 10 x Puffer hergestellt. Das Reaktionsvolumen wurde in der Regel auf 10 µl/µg DNA eingestellt, mit einer Enzymmenge, die nach der Formel

$$\frac{\text{MW } \lambda\text{-Phagen DNA}}{\text{MW DNA}} \times \frac{\text{Anzahl der RE-Schnitte in der DNA}}{\text{in der } \lambda\text{-Phagen DNA}} = \text{Units Enzym}/\mu\text{g DNA}$$

für einen 1-stündigen Verdau berechnet werden konnte. Bei

Reaktionszeiten von mehreren Stunden (z.B. über Nacht), konnte die Enzymmenge auf 1/10 - 1/20 reduziert werden. Das Temperaturoptimum der Restriktionsenzyme lag bei 37°C, ausgenommen das Enzym Bcl I, das eine Temperatur von 50°C benötigte. Die Reaktion wurde entweder durch Zugabe von 1 µl Stopmix (10-fach konzentriert: 20 mg/ml Bromphenolblau, 20 mg/ml Orange G, 20 mg/ml Xylencyanol, 60% Sucrose, 20 mM EDTA, 6 M Harnstoff), oder durch 10-minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt.

Bei einem Partialverdau, meist für präparative Zwecke, wurden prinzipiell nur 1/10 - 1/20 der nach o.a. Formel berechneten Enzymmenge eingesetzt. Vom Reaktionsvolumen wurden 3 µl Aliquots entnommen und jeweils 10, 20, 30, 40, 60 min inkubiert, während der Rest bei -20°C eingefroren wurde. Die Kontrollen wurden auf ein Minigel (4x7 cm) aufgetragen, um die optimale Inkubationsdauer für den großen zurückbehaltenen Teil zu bestimmen. Vor dem Auftrag der -entsprechend der ermittelten Inkubationszeit verdauten- DNA auf ein präparatives Gel wurde nochmals, mittels eines analytischen Minigels, auf korrekten Partialverdau überprüft.

2.6. DNA-Fragmentisolierung durch Elektroelution

Die durch einen Restriktionsenzymverdau entstandenen DNA Fragmente wurden mit Hilfe eines präparativen Agarosegels (s.u. 2.4.2.) getrennt. Nach Färben der DNA im Gel durch Ethidiumbromid wurden die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht von 360nm Wellenlänge mit einem Skalpell oder einer Rasierklinge ausgeschnitten. Die Agarosestreifen mit den DNA-Banden wurden zusammen mit wenig TE Puffer (10 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 7,5) in Dialyseschläuche, die zuvor mit ca. 50 mM EDTA 10-20 min ausgekocht worden waren, dicht verpackt. In der Elektrophoresekammer wurde bei 120 V so lange eluiert, bis im UV Licht keine DNA Banden mehr in der Agarose zu sehen waren. Um zu verhindern, daß die DNA-Fragmente an den Dialyseschläuchen anhafteten, wurde die Gelkammer umgepolt, bzw. die Schläuche in der Kammer umgedreht, und 10 sec in Gegenrichtung eluiert. Mit einer Pasteurpipette wurde der Puffer mit den DNA-Fragmenten aus den Schläuchen

abgesaugt und anschließend mit frischem TE Puffer (10 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 7,5) nachgespült. Nach dreimaliger Phenolextraktion und zweimaligem Ausschütteln mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde die DNA äthanolpräzipitiert und in der für weitere Reaktionen notwendigen Wasser- oder Puffermenge gelöst.

2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

(A. Dugaiczky, H.W. Boyer, H.M. Goodman (32))

Zur Anwendung kamen die Methoden, die von Dugaiczky et al. 1975 beschrieben wurden.

Das Reaktionsvolumen für die Ligation zweier DNA-Stücke schwankte je nach Größe der Stücke und deren Konzentration zwischen 10 und 100 µl und wurde für jede Reaktion ebenso gesondert berechnet, wie bei der Religation (Zirkularisation) eines einzelnen DNA-Fragments. Alle Reaktionen wurden in PNK Puffer (50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 10 mM Mercaptoäthanol, 1 mg/ml BSA) mit 20 mM ATP und 0,2 µl (Ligation zweier Fragmente) bzw. 1 µl (Zirkularisation) T₄ DNA Ligase durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug bei Ligationen zweier Fragmente 15 - 30 min bei 12° - 14°C, bei Zirkularisierungen 12-14 Std bei 4°C. Zur Berechnung der DNA Konzentration diente die Formel

$$\frac{j}{i} = \frac{51,1}{\{DNA\} \times (MW)^{1/2}} \quad (\text{Dugaiczky et al. 1975})$$

Dabei bedeutet j die Anzahl der DNA-Enden, die für Zirkularisierungen zur Verfügung stehen, i die Anzahl der DNA-Enden, die für Ligationen zweier benachbarter Moleküle zur Verfügung stehen, {DNA} die Konzentration der DNA im Reaktionsvolumen, MW das Molekulargewicht der DNA. Entscheidend für den Ablauf der Reaktion war das $\frac{j}{i}$ Verhältnis. Sollten bevorzugt Ligationen benachbarter Moleküle stattfinden, mußte das Verhältnis <1 sein, sollten bevorzugt Zirkularisationen stattfinden, mußte das Verhältnis >1 sein. Dies sind allerdings nur theoretische Werte. In der Praxis mußten Verhältnisse gewählt werden, die für Zirkularisationen >2, für Ligationen benachbarter Moleküle <0,5 waren.

2.8. DNA Phosphataseverdau (132)

Um zu verhindern, daß nach dem Einbau eines DNA-Stückes in einen bakteriellen Vektor der Hintergrund mit rein vektortragenden transformierten Bakterien zu groß ist, wurde vor der Ligation der linearisierte Vektor mit alkalischer Phosphatase inkubiert. Hierzu wurden 10 µl Phosphatase in einer Eppendorf Zentrifuge 1 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 50 µl H₂O bidest. gemischt. 1 µl hiervon wurden zu jeweils 5-10 µg Vektor DNA in Tris Puffer (10 mM Tris, pH 8,5) gegeben und 30 min bei 60°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch dreimalige Phenolextraktion gestoppt. Nach zweimaligem Ausschütteln mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und Äthanolpräzipitation konnte die DNA für die Ligasereaktion verwendet werden.

2.9. Bakterientransformation

(M. Mandel, A. Higa (68))

Für die Transformation mit den entsprechenden Plasmiden standen die Bakterienstämme E. Coli HB 101 und E. Coli GM33 für Plasmide, die nicht methyliert werden durften, zur Verfügung. Alle für die Bakterien verwendeten Gefäße, Medien und Lösungen waren bei 120°C, 2 atü und Wasserdampfsättigung 30 min autoklaviert worden.

500 µl einer Glycerinkultur (500 µl Bakteriensuspension in LB-Medium + 500 µl Glycerin) wurden in 50 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C im Schüttelkolben schüttelnd inkubiert. Hiervon wurden am folgenden Tag 1 ml in 100 ml frisches LB-Medium überimpft und unter o.g. Bedingungen inkubiert.

Sobald die Bakterienkultur eine OD_{650 nm} von 0,8 erreicht hatte, wurde sie rasch abgekühlt und eine halbe Stunde auf Eis gehalten. 20 ml der kalten Suspension wurden in einer Sorvall Zentrifuge im Rotor SS 34 bei 4°C und 5 000 UpM 5 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml kaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und wie o.a. zentrifugiert. In 2 ml kaltem 50 mM CaCl₂ wurde das Pellet erneut gelöst und zur Kompetentmachung 30 min auf Eis inkubiert. 100 µl dieser Suspension kompetenter Bakterien wurden dann mit

100 µl TCM Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂) und jeweils 20, 100 und 200 ng Plasmid DNA gut gemischt und 30 min, gelegentlich schüttelnd, auf Eis inkubiert. Daran schloß sich ein Hitzeschock von 1 min bei 41°C und eine Erholungsphase von 10 min bei 20°C an, bevor nach Zugabe von 1 ml kaltem LB-Medium und einstündiger Inkubation bei 37°C und Bewegung auf dem Schüttler eine weitere Erholung ermöglicht wurde. Von dieser Bakteriensuspension wurden 0,5 ml auf angewärmte, abgetrocknete Agarplatten mit 10 cm Durchmesser, welche das dem Resistenzgen der Plasmid DNA entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert. Nach 12-18 Std Inkubation bei 37°C waren die Kolonien der resistenten Bakterien - sie hatten das DNA-Plasmid mit dem Resistenzgen durch Transformation aufgenommen - groß genug, daß sie sicher von den Platten in Flüssigkulturen überimpft werden konnten.

Zur Kontrolle der Transformation wurden leere Bakterien (ohne Resistenzplasmid), leere kompetente Bakterien und, parallel nur mit Vektorplasmid transformierte Bakterien, auf Antibiotika-haltige und Antibiotika-freie Agarplatten ausplattiert.

Zur Herstellung der Agarplatten wurde 1 l LB-Medium mit 14 g Difco-Bacto-Agar versetzt, zu o.g. Bedingungen autoklaviert und im abgekühlten, aber noch flüssigen Zustand, das Antibiotikum zugesetzt. Der Boden von sterilen Petrischalen mit 10 cm Durchmesser wurde mit dem Agar-Medium vollständig ausgegossen und sofort mit einem Plastikdeckel abgedeckt. Nach dem Erstarren konnten die Platten bei 8°C bis zu 3 Wochen gelagert werden, bevor sie vor Gebrauch mehrere Stunden auf 37°C angewärmt wurden.

2.10. Schnellisolierung von Plasmiden ("Miniprep.")

(Zu Screeningzwecken entwickelte Methode von Horowicz et al. (55))

Resistente Bakterienklone wurden mit sterilen Zahnstochern von den Agarplatten entnommen und an der Innenwand von sterilen Glas- oder Kunststoffröhrchen von 10-20 ml Vol. abgestrichen. Mit 2,5 ml sterilem antibiotikahaltigem LB-Medium

wurden die Bakterien von der Wand ins Medium gespült und nach luftdurchlässiger Abdeckung der Röhrchen über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. 2 ml der Bakteriensuspension wurden in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert. 0,5 ml der Suspension wurden in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße zu 0,5 ml sterilem Glycerin pipettiert und nach guter Mischung, als Glycerinkultur, bei -20°C gelagert. Die 2 ml Fraktionen wurden in einer Eppendorf Tischzentrifuge 1 min zentrifugiert. Zum Pellet wurden 100 µl 50 mM Glucose, 25 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA gegeben, mit dem Vortex gut gemischt und 5 min bei 22°C inkubiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte nach Zugabe von 200 µl 0,2 N NaOH, 1% SDS, wobei ebenfalls wieder gut gemischt und 5 min auf Eis inkubiert werden mußte. Mit Zugabe von 150 µl kaltem 5 M K-Acetat, pH 4,8 (2 M Essigsäure + 3 M K-Acetat) präzipitierten die Proteine und die chromosomale DNA nach 5 min bei 0°C. Zur Abtrennung der Plasmid-DNA wurde 2 min in der Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert und der wasserklare Überstand vorsichtig entnommen. Aus dem Überstand wurde durch Zugabe des zweifachen Volumens absoluten Äthanol nach 2 min bei 22°C die Plasmid-DNA mitsamt RNA ausgefällt. Nach erneuter einminütiger Zentrifugation in der Eppendorf Tischzentrifuge war die DNA pelletiert und nach Waschen mit 70% Äthanol und evtl. einer Vakuum-Trocknung von max. 1 min war das Plasmid genügend rein, um es einem Restriktionsenzymverdau unterziehen zu können. Gelöst in 60-80 µl sterilem H₂O bidest., genügten 10 µl Aliquots für einen Verdau und den Auftrag auf ein Agarose Gel. Für den Auftrag auf ein Minigel (4x7 cm) genügten 5 µl Aliquots.

2.11. Zellkultur und Transfektion

2.11.1. Vorbereitung der Zellen für die Transfektion (93)

Zwei bis drei Tage vor einer Transfektion wurden die Zellen dem flüssigen Stickstoff, in dem sie aufbewahrt worden waren, entnommen und im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Zusammen mit 10 ml frischem, auf 37°C angewärmtem DMEM mit 0,35% Glucose, 1 mM Hepes, 10% hitzeinaktiviertem FCS und Antibiotika (DMEM+) wurden sie in sterile Zentrifugenröhrchen über-

führt und 5 min bei 1 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml frischem, 37°C warmem DMEM+ resuspendiert und in eine 75 cm² Falcon Flasche transferiert. Die Zellen wurden danach bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5% CO₂ und 100% rel. Feuchte so lange kultiviert, bis sie sich erholt hatten (18-24 Std), bzw zur erforderlichen Zellzahl herangewachsen waren.

Zur Vorbereitung für die Transfektion wurde das Nährmedium entnommen und 1-2 ml 0,25%iges Trypsin in PBS Puffer (0,2 g KCL, 0,2 g KH₂PO₄, 8 g NaCl, 1,15 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O bidest) mit 0,02% EDTA zugegeben. Nach kurzer Einwirkung (1-2 min) wurde das Trypsin wieder abgezogen und die Zellen mit dem verbliebenen Trypsin-Rest so lange inkubiert, bis sie sich vom Boden der Flasche vollkommen abgelöst und abgekugelt hatten. Mit 10 ml frischem DMEM+ wurden die Zellen vom Boden abgespült, in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und 3 min bei 1 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 3 ml DMEM+ gut resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden nach Auftropfen der Zellsuspension an den Rand des Deckglases (nach schwachem Befeuchten so fest auf die Zählkammer gedrückt, daß sich Newton-Ringe bildeten) und Einfließen in die Zählkammer, 4 große Quadrate ausgezählt. Die ermittelte Zahl wurde durch 4 geteilt, und das Ergebnis gab nach Multiplikation mit 1 x 10⁴ die Anzahl der Zellen pro ml Medium an. Daraufhin wurden 1 x 10⁵ Zellen in Petrischalen mit 3,5 cm Durchmesser eingesät und das Medium auf 2,5 ml ergänzt. Nach 12-16 stündiger Kultivierung der Zellen unter o.g. Bedingungen wurde nochmal das Medium gewechselt, um tote Zellen und toxische Produkte zu entfernen, bevor mit der Transfektion begonnen werden konnte.

2.11.2. Transfektion

(M. Wigler, A. Pellicer, S. Silverstein, R. Axel (139))

1-10 µg Plasmid DNA, mit einer Konzentration von 1µg/µl in TE Puffer (20 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5) gelöst, wurde mit 10 µg gescherter Kalbsthymus DNA (lyophylisierte Kalbsthymus DNA wurden in 20 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5 mit einer

Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gelöst und 20-30 mal mit einer Spritze durch eine 22er Nadel gedrückt; anschließend wurde steril filtriert) und 12,5 μl 2,5 M CaCl_2 vermischt und mit sterilem H_2O bidest. auf 125 μl aufgefüllt. Diese Mischung wurde tropfenweise, unter ständigem Schütteln, zu 125 μl sterilem 2 x HBS (8,0 g NaCl , 0,38 g KCL , 0,13 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,0 g Glucose, 5,0 g Hepes in 0,5 l H_2O bidest. gelöst und mit NaOH auf pH 7,12 eingestellt) zugegeben. Nach 20-30 minütiger Inkubation und erneutem gutem Aufschütteln wurde das Reaktionsvolumen tropfenweise in 2,5 ml Nährmedium auf 1×10^5 Zellen gegeben. Mindestens 9 bis höchstens 14 Std wurden die Zellen im Brutschrank zu o.g. Bedingungen inkubiert, bevor durch mehrmaligen Mediumwechsel das Präzipitat, möglichst vollständig, von den Zellen wieder entfernt wurde. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsinisiert und in eine Petrischale von 10 cm Durchmesser passagiert.

2.11.3. Weichagar-Selektion (67)

Petrischalen mit 5 cm Durchmesser wurden mit 5 ml 0,5%igem Nähragar (1 Vol. 1% Agar in H_2O bidest. mit 1 Vol. 2 x DMEM+ gemischt) ausgegossen. Nach Erstarren wurde mit 0,33%igem Nähragar (1 Vol. 1% Agar in H_2O bidest. mit 1 Vol. 2 x DMEM+ und 1 Vol. zellhaltigem DMEM+ gemischt), der 1×10^4 Zellen enthielt, überschichtet. Die Softagarschalen wurden unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert und jeden dritten Tag mit 2 ml 0,33%igem Nähragar (ohne Zellen) neu überschichtet. Nach 2 Wochen waren die ersten Klone transformierter Zellen unter dem Mikroskop sichtbar, die ein bis zwei Wochen später mit an der Spitze dünn ausgezogenen und abgewinkelten Pasteurpipetten unter mikroskopischer Sicht aus dem Softagar abgesaugt wurden. Zum Anwachsen wurden die Klone in kleinere Nunc Zellkultur Schalen von 0,5 cm Durchmesser in normales DMEM+ Nährmedium gegeben. Teilweise mußten sie durch mehrmaliges Aufziehen und Ausdrücken aus einer Spritze erst aus dem Einbettungsagar herausgelöst werden, bevor sie am Boden der Nöpfe anwachsen konnten.

2.11.4. Focus Selektion mit Klonierungsringen (93)

Von den Petrischalen, auf deren Zellmonolayer sich 4-6 Wochen nach der Transfektion makroskopisch sichtbare Foci transformierter Zellen gebildet hatten, wurde das Medium entfernt. Sterile Metall- oder Glaszylinder (Klonierungsringe) von 5 mm Höhe und 2 bzw. 3 mm Innendurchmesser wurden mit einem Ende in steriles Silikonfett getaucht, über einen Focus gesetzt und fest angedrückt. Zur Ernährung des Zellmonolayers wurde wieder DMEM+ in die Petrischalen gegeben. Die Zellen innerhalb des Klonierungsringes blieben mediumfrei und auf sie, in das Lumen des Zylinders, wurde 0,25% Trypsin gegeben und einige Minuten inkubiert. Das Trypsin wurde mit einer Pasteurpipette wieder abgezogen. Unter dem Mikroskop wurde der Ablösevorgang der Zellen innerhalb des Zylinders und ihre Abkuglung verfolgt, um sie dann mit einer Pasteurpipette in ein paar Tropfen Medium zu suspendieren und abzusaugen. Nach Überführen in Kulturnapfe von 0,5 cm Durchmesser auf Costarplatten wurden die Zellen unter normalen Bedingungen kultiviert.

2.12. Radio Immun Assay

Zur Ermittlung der Rate der HBsAg Sekretion in das Nährmedium der transfektierten Zellen wurde der Radio Immun Assay Aus RiaII von Abbot Industries angewendet. In Mikrotiterplatten wurden antikörperbeschichtete Plastikugeln gegeben, 200 µl Medium zupipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am Anfang und Ende der Platten wurden als Kontrollen jeweils 200 µl mitgeliefertes HBsAg positives und negatives Humanserum auf die Kugeln gegeben. Nach Inkubation wurde jeder Napf 15 mal mit insgesamt ca. 15 ml H₂O gewaschen und 200 µl mit J¹²⁵ radioaktiv markierter Antikörper eingefüllt. Bei 41°C wurde 2 Std inkubiert und wieder wie o.a. gewaschen. Die Kugeln wurden in Zählröhrchen gefüllt und in einem Gammacounter 1 min gemessen. Als positiv gilt ein Wert, der den um den Leerwert verminderten Negativwert um das 2,1-fache übersteigt.

3. Ergebnisse

3.1. Plasmidkonstruktion

3.1.1. Kopf-zu-Schwanz Tandemarrangement zweier HBV Genome im Plasmid BR322 (s. Abb.5).

Die HBV-DNA mit der die Klonierungsarbeiten durchgeführt wurden, war von Cummings et. al. (26) aus einem Hepatitis B Virus des Serotyps adw isoliert und in das Plasmid A01 kloniert worden (s. Abb. 3+4). Der Integrationsort im pA01 ist die EcoRI Schnittstelle, die sowohl im Plasmid als auch in der HBV-DNA nur einmal schneidet und übereinkunftsgemäß als Nullpunkt bei der Basenpaarsequenzierung gewählt wird. Auf der HBV-DNA liegt die EcoRI Schnittstelle in der Pre-S Region der Sequenz, die für das Surface-Antigen kodiert, sodaß durch die Linearisierung mit dem Restriktionsenzym und die anschließende Neukombination mit dem Plasmid die Integrität der Sequenz zerstört wurde. Eine HBsAg Expression ist mit diesem Plasmid nicht möglich.

Soll ein Plasmid konstruiert werden, das die Fähigkeit zur HBsAg Expression besitzt, muß die HBV-DNA wieder durch einen EcoRI Verdau aus dem Plasmid A01 herausgetrennt und mit sich selbst zirkularisiert, oder mit einem zweiten HBV-DNA Molekül, das ebenfalls in der EcoRI Schnittstelle linearisiert ist, in Kopf-zu-Schwanz Tandemformation hintereinandergeschaltet werden. In beiden Fällen ist die folgerichtige und ununterbrochene Sequenz des HBsAg wieder hergestellt.

Die Rekonstitution des HBsAg Gens durch zwei hintereinandergeschaltete HBV-DNA Moleküle bietet gegenüber der Religation eines einzelnen HBV-DNA Moleküls mehrere Vorteile. Wird das HBV-DNA Molekül in der EcoRI Schnittstelle rezirkularisiert, muß es zur Integration in ein Plasmid oder einen Expressionsvektor zur Schonung der HBsAg Sequenzen mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden, das außerhalb dieser Sequenzen schneidet. Auf dem sehr kleinen HBV Genom werden dabei immer codierende Sequenzen zerstört. Zudem gibt es kein brauchbares Restriktionsenzym das außerhalb der HBsAg Sequenz nur einmal schneidet. Das macht entweder

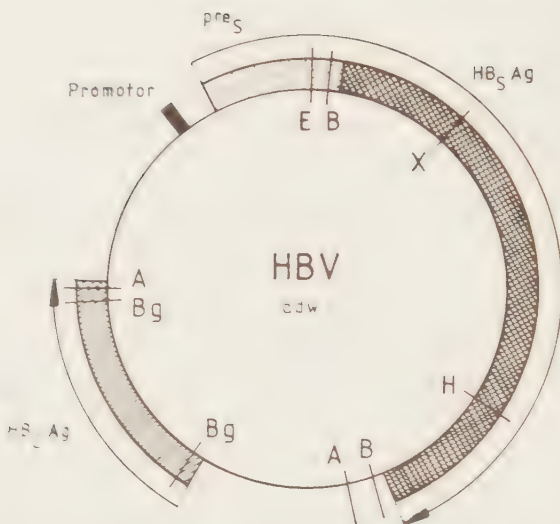


Abb. 4: HBV Genom im Plasmid AO1 kloniert (26)
 Kana^R = Kanamycinresistenz, B = BamHI, X = XbaI, H = HpaI, Bg = BglII, E = EcoRI

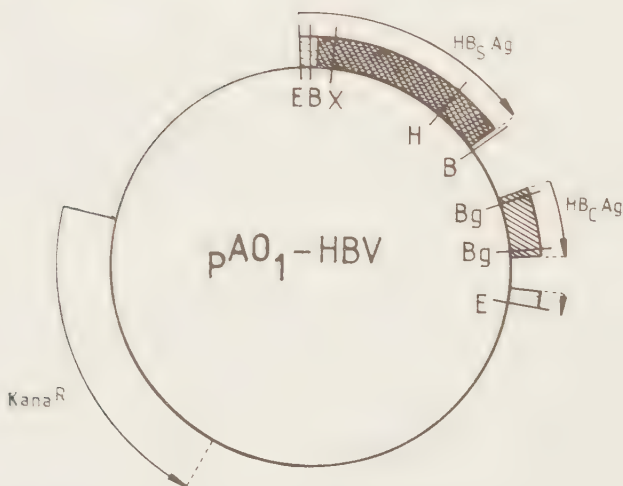


Abb. 4: HBV Genom im Plasmid AO1 kloniert (26)
 Kana^R = Kanamycinresistenz, B = BamHI, X = XbaI, H = HpaI, Bg = BglII, E = EcoRI

Partialverdau notwendig, oder führt zum Verlust einzelner Sequenzen. Im Tandemarrangement zweier HBV Moleküle ist hingegen ein HBV Genom mit ununterbrochener Sequenz vorhanden, das prinzipiell alle Gene exprimieren könnte. Zusätzlich enthält die Konstruktion ein in der Pre-S Region des HBsAg unterbrochenes zweites Genom, das zwar nicht mehr HBsAg, aber noch HBcAg oder HBeAg exprimieren könnte. Interessant ist die Konstruktion aber deshalb, weil ein einfacher Zugriff (RE-Verdau ohne Rekonstitution) auf jedes beliebige HBV Gen besteht.

Zur Klonierung der beiden HBV Genome wurde nicht mehr das Plasmid A01, sondern das kleinere und besser charakterisierte pBR 322 als bakterieller Vektor gewählt (s. Abb. 5). Das Plasmid mit der gesuchten Kopf-zu-Schwanz Tandemformation der HBV Genome konnte durch Verdau mit den Restriktionsenzymen HpaI oder XbaI ermittelt werden. Diese beiden Enzyme schneiden nur einmal im HBV Genom, nicht aber im Plasmid BR322. Ist die HBV-DNA in o.g. Formation hintereinandergeschaltet, und nur das liefert ein expressionsfähiges HBsAg Gen, resultieren nach einem HpaI Verdau z.B., zwei DNA Fragmente. Das kleinere Fragment repräsentiert ein komplettes HBV Genom von 3 200 Basenpaaren (bp), das Größere ein pBR322 mit anhängenden HBV Sequenzen von insgesamt 1 920 bp. Bilden die beiden HBV Genome aber eine Kopf-zu-Kopf Formation, so entsteht nach HpaI Verdau ein Fragment von 1 920 bp und eines von 8 842 bp; bilden sie eine Schwanz-zu-Schwanz Formation, entstehen Fragmente von 5 120 und 5 642 bp. Die Orientierung der beiden HBV Genome (Kopf-zu-Schwanz versus Schwanz-zu-Kopf) zum bakteriellen Vektor pBR322 läßt sich durch einen Doppelverdau z.B. mit den Restriktionsenzymen HpaI und HindIII ermitteln. Dabei entstehen drei Fragmente, die entweder 989bp, 3 200bp und 6 573 bp betragen, was dem Plasmid HBT119 entspricht (s. Abb. 5), oder 2 275bp, 3 200bp und 5 287 bp betragen.

Wie oben dargestellt, war es zunächst nötig das mit der im HBsAg Gen liegenden EcoRI Schnittstelle in das Plasmid A01 integrierte HBV Genom wieder mit dem gleichen Restriktionsenzym herauszutrennen. Die hierzu nötige Enzymmenge errechnete sich mit dem Molekulargewicht des Plasmids von $9,2 \times 10^6$ Dalton nach der unter Nr.

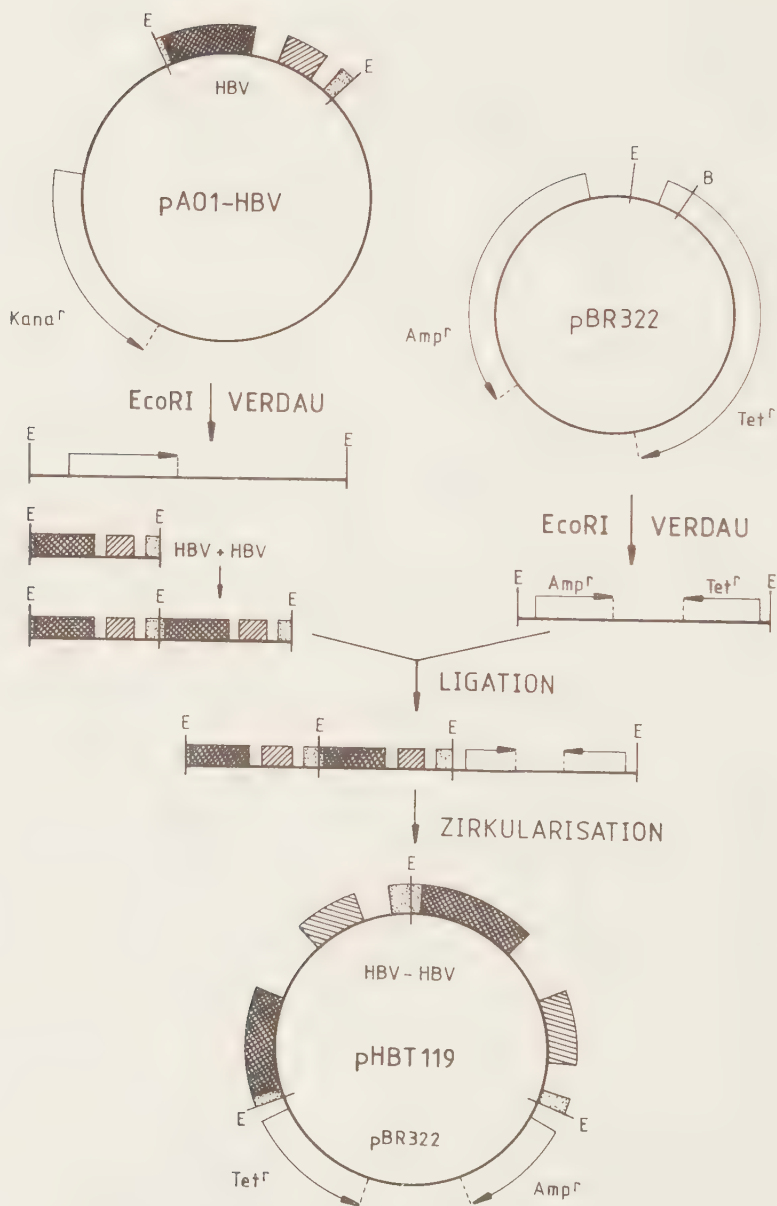


Abb. 5: $Kana^r$ = Kanamycinresistenz, Amp^r = Ampicillinresistenz, Tet^r = Tetrazyclinresistenz, E = EcoRI, B = BamHI.

2.5. angegebenen Gleichung auf 1,4 U/ μ g DNA. Dies ist die Enzymmenge mit der 1 μ g Plasmid DNA (pA01-HBV) in 1 Std. verdaut wird. Bei einem Einsatz von 100 μ g ergeben sich 140 U Enzym. Da aber 12 Std. inkubiert wurde, konnte die Menge auf $1/20 = 7$ U reduziert werden. Zur Kontrolle des Verdaues wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (s. Abb. 6). Zur Abtrennung der HBV-DNA Bande vom Plasmid A01 wurde ein präparatives Agarosegel mit der gesamten Probe beschickt und nach einem Trennungslauf die HBV Bande ausgeschnitten und aus der Agarose eluiert.

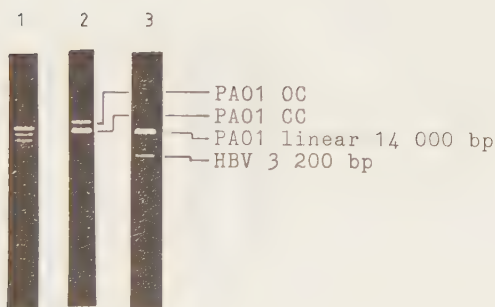


Abb. 6: Elektrophoretische Kontrolle des pA01-HBV Verdaues mit EcoRI.

100 μ g DNA in 500 μ l 100 mM NaCl Reaktionspuffer wurden 12 Std. bei 37°C mit 10 U EcoRI inkubiert. 5 μ l (1 μ gDNA) wurden mit 5 μ l Stopmix gemischt und auf ein 1% Agarose Slab-Gel aufgetragen (Spur 3). Als Referenz in Spur 2 1 μ g des Plasmids pA01-HBV und in Spur 1 1 μ g λ -Phagen DNA, HindIII geschnitten, als MG Marker. Laufzeit 3 Std. bei 80 V, Belichtung mit UV-Licht von 360 nm (Durchlicht) 10 sec, Blende 8, Abstand 30 cm auf Polaroid 766. Vorher 15 min Färben in 1% Ethidiumbromid und 15 min Entfärben in H₂O.

Ligation HBV-HBV

Bei der Ligation zweier DNA Moleküle miteinander ist es wichtig die DNA Konzentration im Reaktionsvolumen so einzustellen, daß in erster Linie Kettenmoleküle gebildet werden und möglichst wenig Selbstzirkularisationen stattfinden. In der Formel von Dugai-czyk et. al. (s. u. 2.7.) gibt das Verhältnis j/i an, in welche Richtung die Reaktion bevorzugt abläuft. In diesem Fall -HBV-HBV Ligation- muß ein Verhältnis unter 1 angestrebt werden. Da j vom MG der HBV-DNA abhängt und daher konstant ist, kann nur i (konzentrationsabhängig) variiert werden. Durch Umformung o. a. Gleichung ergibt sich:

$$\{DNA\} = \frac{51,1}{j/i \times (MW)^{1/2}}$$

womit bei Vorgabe des gewünschten j/i Verhältnisses die entsprechende DNA Konzentration ($\{DNA\}$) in g/l berechnet werden kann. Bei einer DNA Konzentration von 10 µg /100 µl ergibt sich ein j/i Verhältnis von 0,35, ausreichend für eine zufriedenstellende Kettenbildung. Nachdem zuvor 100 µg pAO1-HBV DNA mit EcoRI verdaut worden waren, s. o., der HBV Anteil am Plasmid nur ca. 20% beträgt und durch Reinigungs- und Trennungsschritte gewisse DNA Verluste berücksichtigt werden mußten, konnte auch nur mit 10-15 µg HBV-DNA für das Reaktionsvolumen von 100 µl gerechnet werden. Das Ergebnis der Ligation zeigt Abb. 7. Neben HBV Dimeren und -Polymeren hat sich auch zirkuläre HBV-DNA gebildet, repräsentiert von der kräftigsten Bande, die direkt über der linearen HBV Bande liegt.

als nächster Schritt folgte nun der Verdau des bakteriellen Vektors pBR322 mit dem RE EcoRI unter den unter Nr. 2.5. angeführten Bedingungen (s. Abb. 7).

Zur Ligation der HBV Polymere mit dem Plasmid wurde der HBV-HBV Ligationsansatz auf das Äthanolpräzipitat des EcoRI geschnittenen pBR322 pipettiert. Dadurch wurde, bei konstantem Volumen, der Anteil der für Ligationen zur Verfügung stehenden Enden vergrößert und es konnte davon ausgegangen werden, daß wiederum Kettenbildungen bevorzugt werden. Um jedoch einen ungefähren Anhalt zu

haben, ob nach Auffüllen des Volumens auf 1 ml Ringbildung statt Kettenbildung bevorzugt wurde, mußte die DNA Konzentration ungefähr kalkuliert werden. Wie in Abb. 7 zu sehen ist, führte die Ligation der HBV DNA dazu, daß ein großer Teil der DNA zirkularisiert worden war und daher für Ligationen nicht mehr zur Verfügung stand. Ein anderer Teil der DNA blieb als lineares Monomer zurück und stand ebenso für Ligationen mit dem Plasmid BR322 zur Verfügung wie die Polymere. Da aber nur Ligationsprodukte der Dimere mit dem pBR322 interessierten, ist für die Kalkulation des j/i Verhältnisses deren MG einzusetzen, das bei gleicher DNA Konzentration ungünstiger für Ringbildungen (kleineres j) ist, als die Monomere. Die Ligationsprodukte der Monomere sowie die Monomere einschließlich pBR322 selbst, müssen für die DNA Konzentration aber voll berücksichtigt werden.

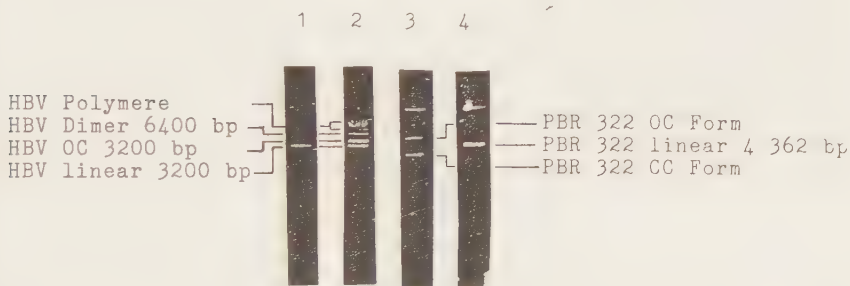


Abb. 7: Gelelektrophorese des HBV-HBV Ligationsproduktes (Spur 2).

10 - 15 µg HBV-DNA in 100 µl PNK Puffer (0,3 M Tris HCl pH 8,0; 30 mM MgCl₂; 50 mM Mercapto Äthanol (= 5xPuffer)). wurden mit 0,5 µl T₄ DNA Ligase 60 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch 60 min Erwärmen auf 68°C gestoppt. Ein 10 µl Aliquot des Ligationsansatzes wurde nach Mischen mit 1 µl Stopmix auf ein 1% Agarose Slab-Gel aufgetragen. Laufzeit 2Std. bei 100 V. In Spur 1 war 0,5 µg lineare HBV-DNA nach EcoRI Verdau aufgetragen. In Spur 4 lief 0,6 µg EcoRI linearisierte pBR322 DNA, entnommen aus einem Ansatz von 6 µg pBR322 in 50 µl 100 mM Reaktionspuffer und 1 U EcoRI. Die Reaktion wurde durch 10 min Erhitzen auf 68°C gestoppt. Dem Auftrag war, ebenso wie dem Referenzauftrag aus ungeschnittenem pBR322 (0,5 µg), 1/10 Vol. Stopmix beigegeben. Sonstige Bedingungen wie in Abb. 6. Als Referenz lief unverdautes Plasmid in Spur 3.

Ausgehend von max. 5 µg pBR322 (Verluste durch Phenolextraktion) und 10 µg HBV-DNA ergab sich, unter Berücksichtigung der HBV Zirkularisierungen (Abb. 7) und der Ligationen, eine Verminderung der HBV-DNA, die für Zirkularisierungen noch zur Verfügung stand, auf max. die Hälfte der Ausgangsmenge = 7,5 µg. Nimmt man zur Sicherheit einen Wert von 10 µg an, der in 1 ml Reaktionsvolumen gelöst ist, so ergibt das, bei einem MG von $7,3 \times 10^6$ Dalton für ein HBV Dimer mit pBR322, einen j/i Wert von 1,89 und somit ausreichende Ringbildung.

Ein Problem bei der Konstruktion des Plasmids HBT119 war die Tatsache, daß bei der Ligation der HBV Dimere in die EcoRI Schnittstelle des pBR322 keine Möglichkeit besteht, die HBV-positiven Moleküle von den pBR322 Religationen über den Verlust einer Anti-

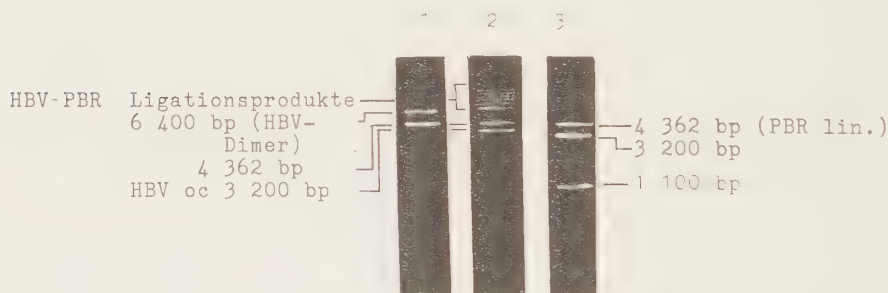


Abb. 8: Präparatives 1% Agarose Slab-Gel zur Isolierung der HBV-HBV-pBR322 Lignationsprodukte.

6 µg pBR322 wurde nach EcoRI Verdau und Phenolextraktion mit Äthanol präzipitiert. Zum DNA Präzipitat wurde der in Abb. 7 beschriebene HBV-HBV Lignationsansatz in ein Reaktionsvolumen von 100 µl PNK Puffer gegeben. Nach 1 Std. Inkubation bei 13°C wurde das Reaktionsvolumen auf 1 ml aufgefüllt, 1 µl T₄-DNA Ligase zugegeben und 24 Std. bei 4°C inkubiert. Zur Volumenreduktion wurde die DNA erneut mit Äthanol gefällt und in 50 µl TE Puffer, dem 5 µl Stopmix beigegeben waren, gelöst. Der Auftrag erfolgte in Spur 2. Als Referenz lief in Spur 1 HBV Dimer und pBR 322 (ca. 1 µg DNA), in Spur 3 liefen MG Marker (1 µg). Laufzeit des Gels 5 Std. bei 100 V, Färbung und Belichtung wie in Abb. 6. Alle Banden von DNA Molekülen, die langsamer liefen als lineare 6 400 bp Stücke (Spur 2) wurden aus der Spur 2 ausgeschnitten und aus der Agarose in Dialyseschläuchen eluiert.

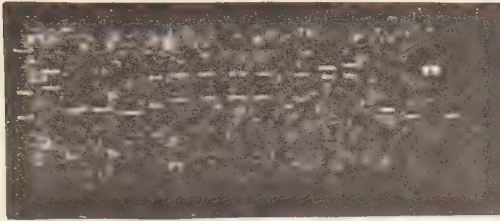


Abb. 9: Screening von transformierten Bakterienklonen nach Plasmiden, die HBV-DNA integriert haben.

Spur 1: pBR322 als Referenz, Spur 2, 12, 13, 16: langsam laufende Plasmide als Kandidaten für integrierte HBV-DNA. Transformierte Bakterienklone, die auf ampicillinhaltigen Agarplatten nach 24 Std. Inkubation bei 37°C gewachsen waren, wurden unter sterilen Bedingungen in 2,5 ml ampicillinhaltiges LB Kulturmedium übertragen und nach 24 Std. Inkubation nach der Methode von Horowicz lysiert. 1/3 der extrahierten Plasmid DNA wurde auf ein Agarose Slab-Gel (1%) in 10 µl Volumina unter Zugabe von 1 µl Stopmix übertragen. Laufzeit 3Std., 100 V, Färbung und Belichtung wie in Abb.6.

biotikumresistenz zu selektionieren. Die EcoRI Schnittstelle liegt zwischen beiden Resistenzgenen des pBR322, womit keines der Gene durch einen Einbau zerstört wird (s. Abb. 5). Da anzunehmen war, daß religiertes Plasmid BR322 die Zahl der Plasmide mit integrierten HBV Sequenzen um ein Vielfaches überstieg, wurde es notwendig, vor der Bakterientransformation den Anteil der BR322 Plasmide zu reduzieren. Dazu wurde nach der Zirkularisation der Moleküle die DNA elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 8, Spur 2). Alle DNA Moleküle, die langsamer liefen als lineare 6 400 bp Stücke (Spur 1), wurden, wie in Abb. 8 beschrieben, isoliert. Mit dieser DNA Fraktion wurden nach der unter Nr. 2.9. angeführten Methode E.coli Bakterien des Stammes K 12 HB 101 transformiert. Die aus den resistenten Bakterienklonen extrahierte Plasmid DNA wurde elektrophoretisch mit dem Plasmid BR322 verglichen (s. Abb. 9). Alle Plasmide, die erheblich langsamer liefen als pBR322 waren potentielle Kandidaten

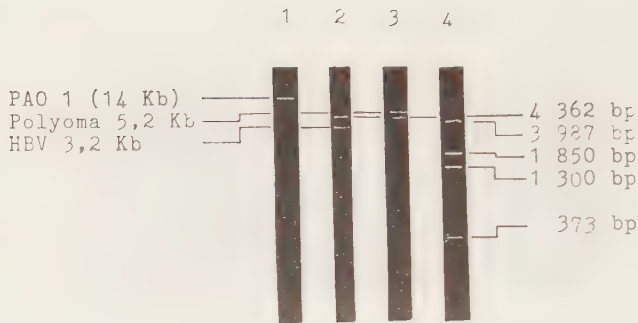


Abb. 10: RE Verdau des Plasmidklones HBT119 zur Ermittlung der Komponenten aus HBV und pBR322.

pHBT119 liefert nach EcoRI Verdau 2 Banden mit 3 200bp und 4362 bp, entsprechend der Genomlänge von HBV und pBR322 (Spur 2). Derselbe Klon liefert nach EcoRI/BamHI Doppelverdau Banden von 3 987bp und 373bp -entsprechend pBR322 verdaut mit EcoRI/BamHI- und Banden von 1 850bp und 1 300 bp -entsprechend HBV verdaut mit EcoRI/BamHI. Noch fehlende 50bp der HBV-DNA kommen im Gel nicht mehr zur Darstellung (Spur 4).

Der Verdau des Plasmids HBT119 mit EcoRI und der Doppelverdau mit EcoRI/BamHI wurden mit je 1/3 der Plasmid DNA, die nach der Minipräp Methode von Horowicz (s. u. 2.10.) gewonnen wurde, durchgeführt. Für die Reaktion wurde je 0,5 U Enzym in 20 µl Reaktionspuffer eingesetzt. Nach 1 stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 2 µl Stopmix gestoppt und die Probe auf ein 1% Agarose Slab-Gel aufgetragen. In Spur 1 lief das Plasmid AO1-HBV nach EcoRI Verdau als Referenz für 14 000bp (AO1) und 3 200bp (HBV). In Spur 3 lief als weiterer MG Marker das Plasmid PY E8, geschnitten mit BamHI als Referenz für 4 362bp (pBR322) und 5 292bp (Polyoma Virus). Laufzeit des Gels waren 3 Std. bei 80 V, sonstige Bedingungen wie in Abb. 6.

für integrierte HBV-DNA. Zur Verifizierung der Annahme wurden langsam laufende Plasmide, z.B. Nr. 119, einem RE-Verdau mit EcoRI (s. Abb. 10 Spur 2 und Abb. 11 Spur 3) unterzogen, womit das Plasmid wieder in seine einzelnen Komponenten, pBR322 und HBV, zerlegt wurde. Im Vergleich mit der HBV Referenz (Abb.10 Spur 1 und Abb. 11 Spur 2), sowie mit der pBR322 Referenz (Abb. 10 Spur 3) konnte bestimmt werden, daß das Plasmid neben pBR322

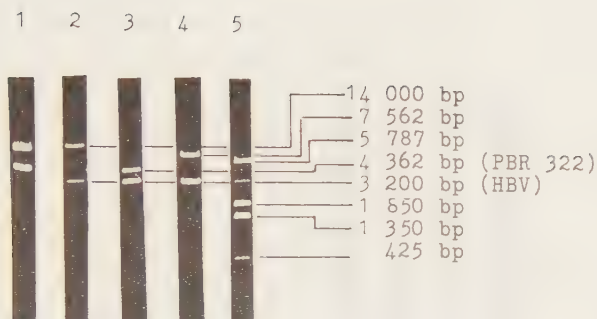


Abb. 11: RE-Verdau zur Ermittlung der Anzahl der HBV Genome und deren Formation im pHTB119.

pHTB119 nach HpaI Verdau (Spur 4) liefert bei Kopf-zu-Schwanz Tandemformation eine 3 200bp Bande (eine Schnittstelle in HBV-DNA) und eine 7 562 bp Bande (HBV und pBR322). In Spur 5 zeigt pHTB119 nach BamHI Verdau zusätzlich die Orientierung der beiden HBV Moleküle zum pBR322 (s. Abb. 5 und Text) Die 3 200 bp Bande resultiert aus unvollständigem Verdau. Zum Vergleich in Spur 1 das ungeschnittene Plasmid pHTB119, in Spur 2 pA01-HBV nach EcoRI Verdau und in Spur 3 pHTB119 nach EcoRI Verdau.

Die Inkubationsansätze mit den RE wurden mit den üblichen RE-Puffern (10 µl/ 1 µg DNA) 12 Std bei 37°C und 1/20 der für 1 Std Inkubationsdauer nötigen Enzymmenge durchgeführt (s. u. Nr. 2.5.). Der Inkubationsansatz wurde nach Zufügen von 1 µl Stopmix auf ein 1% Agarose Slab-Gel aufgetragen. Sonstige Bedingungen s. Abb. 6.

DNA vollständige HBV DNA enthält. Auch der Doppelverdau mit EcoRI/BamHI (Abb. 10 Spur 4) bestätigte diesen Befund. Nun war noch zu prüfen, ob ein oder zwei HBV Genome integriert waren und in welcher Formation sie sich orientiert hatten. Waren sie in Kopf-zu-Schwanz Tandemformation arrangiert, so sollte der Verdau mit HpaI ein HBV Genom von 3 200 bp und ein pBR322 Genom mit anhängenden HBV Sequenzen von insgesamt 7 562 bp liefern. In Abb. 11 Spur 4 und Abb. 12 Spur 2 wird dieses Arrangement des Klonen 119 ersichtlich. Zur sicheren Verifizierung und zur Ermittlung der Orientierung der HBV Genome zum pBR322 wurden noch Verdaue mit dem RE BamHI (Abb. 11 Spur 5) und Doppelverdaue

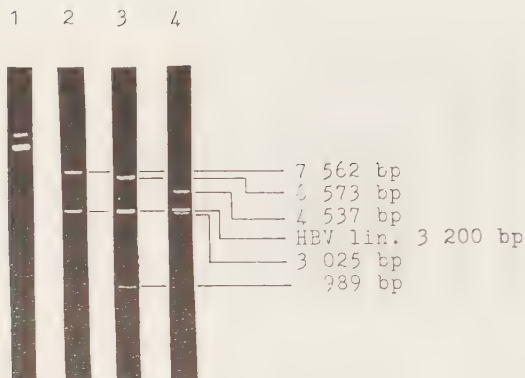


Abb. 12: RE Verdau zur Ermittlung der Orientierung der HBV Genome zum pBR322

RE Verdau mit HpaI (Spur 2) indiziert die Kopf-zu-Schwanz Tandemformation zweier HBV Moleküle. RE Doppelverdau mit HindIII/HpaI (Spur 3) und PvuII/HpaI (Spur 4) indiziert die Orientierung der HBV Genome zum pBR322. Die angeführten Fragmentlängen entsprechen den theoretisch errechneten Basenpaaren (s. Abb. 6 und Text). In Spur 1 als Referenz unverdautes Plasmid HBT119. Alle RE Verdaue wurden wie in Abb. 11 angegeben durchgeführt, übrige Bedingungen entsprechend Abb. 6.

mit den RE HpaI/HindIII (Abb. 12 Spur 3) und HpaI/PvuII (Abb. 12 Spur 4) durchgeführt. Der BamHI Verdau des pHBT119 lieferte Fragmente von 5 787 bp, 1 850 bp, 1 350 bp und 425 bp, während bei umgekehrter Orientierung der beiden HBV Genome zum pBR322 Fragmente von 4 037 bp, 2 175 bp, 1 800 bp und 1 350 bp entstanden wären. Bei dem Doppelverdau HpaI/HindIII standen die Fragmente 6 573 bp, 3 200 bp und 989 bp des pHBT119 den Fragmenten 5 292bp, 3 200 bp und 2 269 bp der Gegenorientierung gegenüber, bei dem Doppelverdau HpaI/PvuII die Fragmente 4 537 bp, 3 200 bp und 3 025 bp den Fragmenten 4 305 bp, 3 457 bp und 3 200 bp. Damit war das Plasmid HBT119, wie im FlieBschemata Abb. 5 dargestellt, eindeutig definiert.

3.1.2. Integration des HBV BglII Fragmentes (HBsAg) in das Polyoma Virus Genom des Plasmids PYD3 (s. Abb. 13).

Der Grundgedanke war, das HBsAg der HBV DNA so in die Polyoma Virus DNA zu integrieren, daß das Gen sicher exprimiert wird. Dabei sollte jedoch die Expression von Polyoma Viren verhindert werden und die zelltransformierende Eigenschaft der Polyoma DNA erhalten bleiben. Auch sollte durch die Wahl des entsprechenden Integrationsortes ausgeschlossen werden, daß "read-through" Proteine, Hybride von Polyoma und HBsAg Protein gebildet werden. Wie aus Abb. 3 ersichtlich, bietet das HBV Genom nicht viele Möglichkeiten, das HBsAg komplett, d.h. mit der "pre-S Region" und den eigenen Promotoren vor der kodierenden Sequenz, herauszutrennen. Nur zwei Restriktionsenzyme, BglII und AvaI, ermöglichen die Excision des funktionsfähigen HBsAg Gens bei gleichzeitigem Verlust des Core-Ag Gens. (Der Verlust ist erwünscht, um eine potentiell mögliche Expression von infektionstüchtigen HB Viren (Dane-Partikeln) auszuschließen, auch wenn eine Virusvermehrung in vitro bisher noch nicht gelungen ist.) Berücksichtigt man, daß bei der Integration des HBsAg Gens in die Polyoma Virus DNA deren transformierende Fähigkeiten erhalten bleiben sollen, so stehen nur die Sequenzen zur Verfügung, die für die späten Proteine Vp1-3 kodieren. Wie in Abb. 14 zu sehen ist, gibt es im Polyoma Genom nur zwei Schnittstellen von Restriktionsenzymen, deren Erkennungssequenz einmal in den späten Proteingenen vorkommen: BamHI mit der Sequenz G↓GATCC und BclI mit der Sequenz T↓GATCA (die Pfeile zeigen die Stelle der Strangtrennung an). Beide RE Schnittstellen sind als Insertionsorte für das HBsAg Gen brauchbar, wenn es mit dem RE BglII aus dem HBV Genom herausgeschnitten wird. Denn BglII mit der Erkennungssequenz A↓GATCT liefert nach Verdau der DNA die gleichen "sticky-ends" (GATC) wie BamHI und BclI, wodurch die basenkomplementäre Aneinanderlagerung und Ligation der einsträngigen Enden möglich wird. Dies wird allerdings erkaufte durch Verlust der Schnittstelle für beide Enzyme, da die 6er-Sequenz durch Austausch einer Base ihre Pallindrom Struktur verliert und nur eine 4er-Sequenz als Pallindrom übrig bleibt.

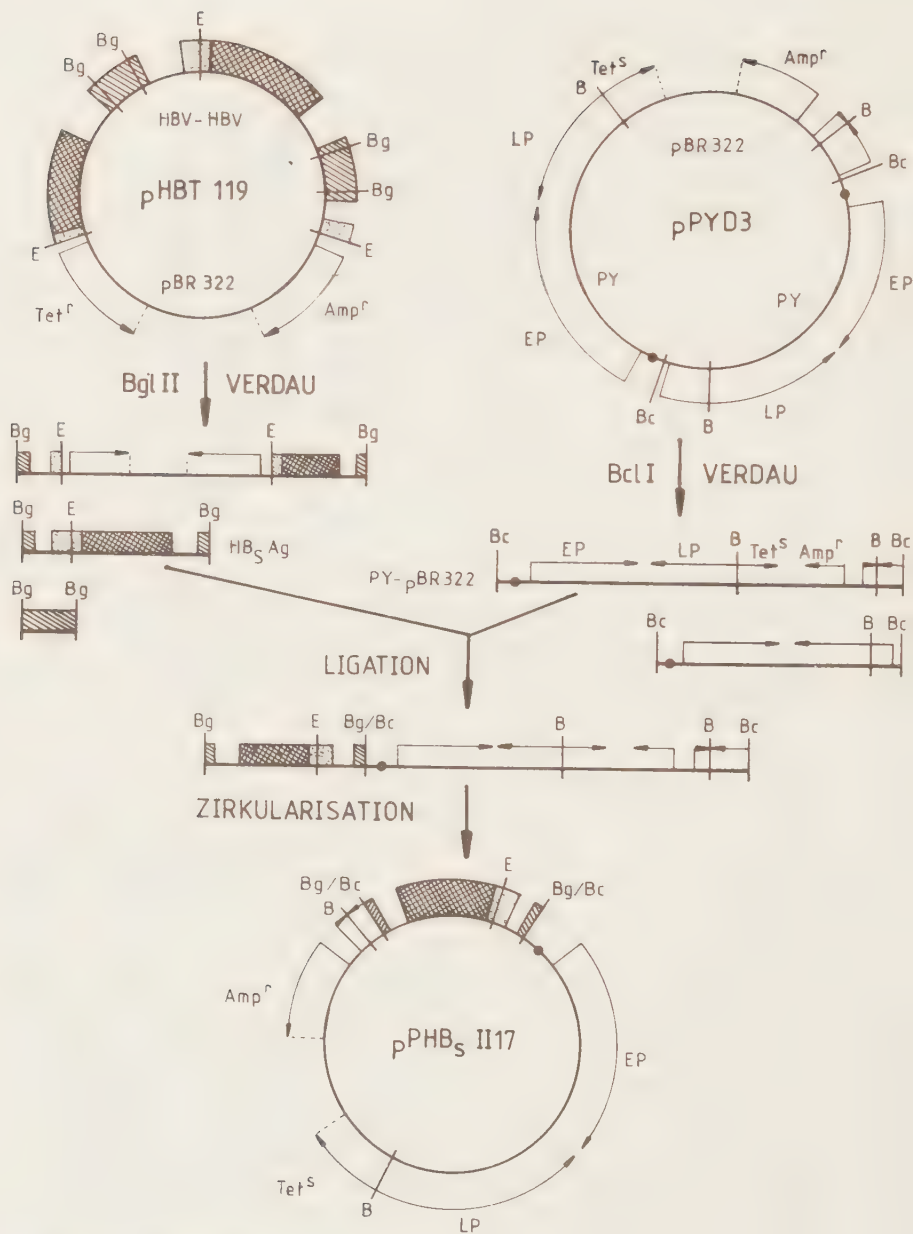


Abb. 18: Tet^r = Tetrazyclinresistenz, Tet^S = zerstörte Tetrazyclinresistenz, Amp^r = Ampicillinresistenz, PY = Polyoma Virus Sequenz, EP = Polyoma "early protein", LP = Polyoma "late protein", E = EcoRI, Bg = BglII, B = BamHI, Bc = BclI.

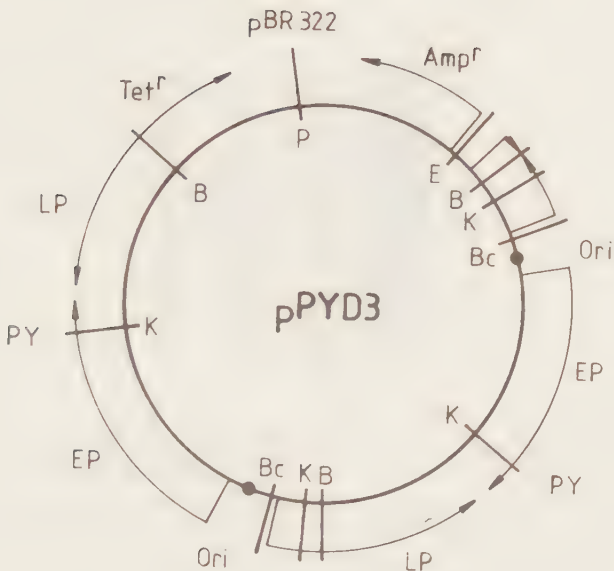


Abb.14: E = EcoRI, B = BamHI, P = PvuII, K = KpnI, Bc = BclI, PY = Polyoma Virus, EP = Polyoma "early protein", LP = Polyoma "late protein", Ori = origin of replication, Tet^r = Tetrazyclinresistenz, Amp^r = Ampicillinresistenz.

Für die BclI Schnittstelle als Integrationsort in der Polyoma DNA (s. Abb. 14) spricht, daß sie zwischen den Promotorsequenzen für die späten Proteine und deren Startsignalen liegt (Soeda et al.(118)). Ein "read-through" ist bei dieser Integrationsstelle, im Gegensatz zur BamHI Stelle, nicht möglich. Es können höchstens bei der Transcription neben den HBsAg eigenen Promotoren die vorgeschalteten Polyoma-Promotoren mitverwendet und die Transcriptionsrate erhöht werden.

Für die Konstruktion des Polyoma-HBV Hybrids standen als Ausgangsmaterial zwei Plasmide zur Verfügung. Das Plasmid HBT 119 (Abb. 5) mit den HBsAg-Gen Sequenzen und das Plasmid PyD 3 mit den Polyoma Sequenzen (Abb. 14). Das Plasmid PyD 3, von Charles Weißmann, Zürich, (36) freundlicherweise zur Verfügung gestellt, enthält zwei Polyoma Genome in Kopf-zu-

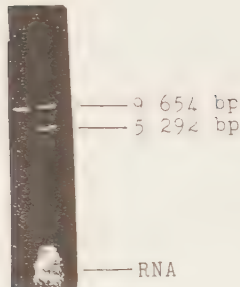


Abb. 15: RE-Verdau der Plasmide PYE8 (Spur 1) und PYD3 (Spur 2) mit BclI, jeweils nach Klonierung in *E. coli* GM33 dam^- .

PYE8 DNA, isoliert aus Massenkultur, ohne RNA, PYD3 DNA, isoliert aus Minipräp. nach Horowicz, mit RNA. Die 9 654 bp Bande entspricht pBR322 mit Polyoma Virus DNA. Die 5 292 bp Bande entspricht Polyoma Virus DNA. Aufgetragen wurden ca. 0,5 μg DNA (PYE8) aus einem Ansatz von 2 μg DNA in 20 μl RE Reaktionspuffer, bzw. 1/3 Vol. eines in 30 μl RE Reaktionspuffer gelösten Minipräp. Lysates (PYD3). Jeweils 2 U BclI wurden zum Ansatz gegeben und 1 Std. bei 50°C inkubiert. Laufzeit 3 Std bei 80 V, sonstige Bedingungen wie in Abb. 6.

Schwanz Tandemarrangement über BamHI verknüpft und in die BamHI site des pBR 322 integriert. Das Plasmid wurde dadurch Tet^S und war über die noch verbliebene Amp^r in *E. coli* K12 HB 101 kloniert worden. Dies brachte jedoch für die angestrebte Neukombination den Nachteil eines zusätzlichen Klonierungsschrittes. Dadurch, daß das HBsAg Gen in die BclI site des Polyoma Genoms gesetzt werden sollte, mußte das Plasmid PyD 3 in den nicht methylierenden *E. coli* Stamm GM 33 dam^- umklont werden, um die DNA mit dem RE BclI schneiden zu können. Das RE BclI schneidet nur, wenn Adenin in der Erkennungssequenz nicht methyliert ist.

Das Plasmid wurde in GM 33 kloniert wie unter Nr. 2.9. und 2.10. beschrieben. Den RE-Verdau mit BclI in der nicht methylierten PyD 3 dam^- DNA zeigt Abb. 15.

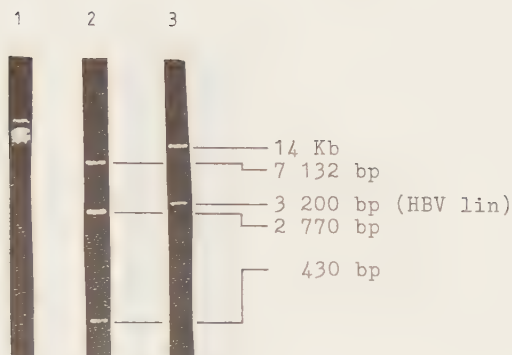


Abb. 16: BglIII-Verdau des pHBT119 zur Entnahme des 2 770 bp HBsAg Segmentes (Spur 2).

Zur Kontrolle in Spur 1 pHBT119 unverdaut, in Spur 3 pAO1-HBV nach EcoRI Verdau als MG-Marker.

50 µg pHBT119 wurden mit 20 U BglIII in einem 10 mM NaCl Reaktionspuffer 12 Std. bei 37°C inkubiert. Zur Verdau-kontrolle wurden 1 µg DNA auf ein 1% Agarose Slab-Gel aufgetragen. Laufzeit 4 Std. bei 80 V, sonstige Beding-ungen wie in Abb. 6.

Nach Vermehrung der PyD 3 dam⁻ DNA in Bakterienmassenkultur und Plasmidisolierung (s.u. 2.2.) wurden 50 µg Plasmid für die Ligation mit den HBsAg Sequenzen mit 50 U BclI in einem 100 mM NaCl-Reaktionspuffer von 500 µl eine Std bei 50°C verdaut. In einem präparativen Gel (s.u. 2.4.2.) wurde die 9654 bp Bande abgetrennt und entsprechend der unter Nr. 2.2.6. genannten Methoden isoliert. Um bei der Ligation mit dem HBsAg Gen die Rate der Religationen von Polyoma-pBR 322 Mo-lekülen möglichst niedrig zu halten, wurde das BclI geschnit-tene Plasmid einem Phosphataseverdau unterzogen (s.u. 2.8.). Durch enzymatischen Abbau einer Phosphatgruppe am 5'Ende der DNA wird eine Ligation mit sich selbst unmöglich gemacht. Nur wenn ein nicht phosphatasebehandeltes DNA Stück sich an-lagert, ist Ligation wieder möglich. Wenn auch nicht alle so behandelten Moleküle außerstande sind sich zu rezirkulari-

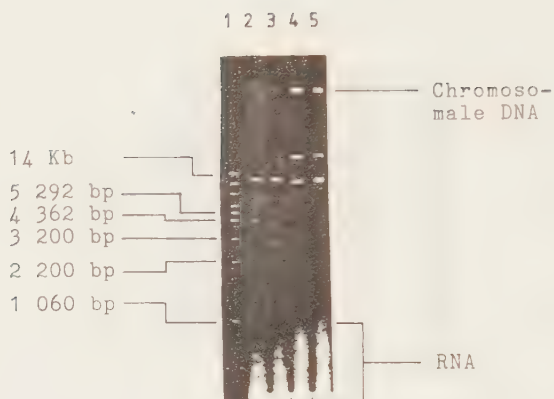


Abb. 17: Screening resistenter Bakterienklone auf Rekombinanten mit HBV Sequenzen.

Resistente Kolonien wurden in Minipräp. nach Horowicz lysiert. Die isolierte Plasmid DNA wurde mit HpaI (schneidet nur in HBV-DNA) geschnitten. In Spur 4 und 5 liefen die ungeschnittenen Plasmide der Klone 14 und 17, in oc- und cc Form jeweils 2 Banden bildend. In Spur 2 und 3 liefen dieselben Plasmide nach HpaI Verdau eine einzige Bande bildend und als lineares Molekül zwischen oc- und cc Form laufend. In Spur 1 ein MG Marker. 1/3 des DNA Isolates in Vol. von 5 µl kam jeweils zum Auftrag. Der Verdau wurde entsprechend den in Abb. 11 beschriebenen Konditionen durchgeführt. Laufzeit 30 min, 100 V auf 1% Agarose Minigel (8 cm lang). Belichtung 7 sec, Blende 6,5, Abstand 10 cm. Sonstige Bedingungen wie in Abb. 6.

sieren, so kann doch die Rate von Vektormolekülen gegenüber Molekülen mit eingebauten Sequenzen erheblich vermindert werden. Eine erneute Auftrennung der Moleküle nach erfolgter Ligation in Agarose, wie bei der Konstruktion des Plasmids HBT 119, erübrigt sich in diesem Fall.

Zur Entnahme des HBsAg Gens wurde das Plasmid HBT 119 mit BglII verdaut (s. Abb. 16). Die 2 770 bp Bande, entsprechend dem BglII Fragment des HBsAg, wurde über ein 1% Agarose Gel isoliert und mit dem phosphataseverdauten Vektorplasmid pBR

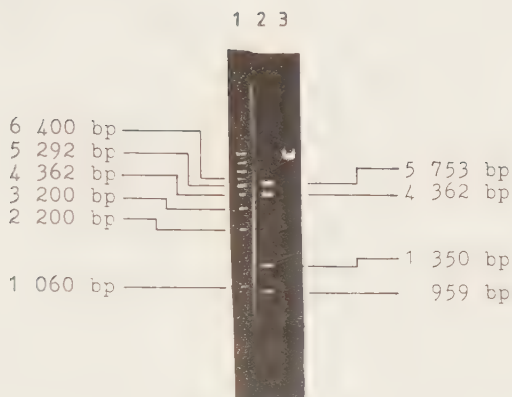


Abb. 18: BamHI Verdau des Plasmids pHBsIII17 zur Ermittlung der Orientierung des HBV Fragmentes zur Polyoma Virus DNA.

0,5 µg DNA wurde entsprechend den beschriebenen Bedingungen (s. u. Nr. 2.5.) in 7 µl Vol. verdaut und auf das Gel aufgetragen (Spur 2). In Spur 3 dasselbe Plasmid nach HpaI Verdau, in Spur 1 ein MG Marker. Laufzeit 30 min bei 100 V, sonstige Bedingungen s. Abb. 17

322-Py ligiert. Bei 1 µg pBR 322-Polyoma DNA und 2 µg 2 770 bp HBV DNA ergaben sich in einem Reaktionsvolumen von 10 µl (s.u. 2.7.) ein j/i Verhältnis für das 9654 bp Fragment von 0,026, für das 2770 bp Fragment von 0,17 (s.u. 2.7. und 3.1.1.). Da in diesem Falle zwei sehr unterschiedlich große DNA Stücke ligiert werden sollten, mußte für jedes Fragment (verschiedene j-Werte) das j/i Verhältnis gesondert berechnet werden. Als i-Wert ist hierbei die Summe beider i-Werte von 1 µg 9654 bp DNA und 2 µg 2770 bp DNA in jeweils 10 µl Reaktionsvolumen einzusetzen. Durch Division des jeweiligen j-Wertes durch den gemeinsamen i-Wert ergeben sich die o.g. j/i Verhältnisse, die weit unter einem für Ringbildungen günstigen Wert liegen. Die Ligation wurde wie o.a. durchgeführt. Aliquots von 1/10 und 1/100 wurden für die Transformation von GM 33 Bakterien verwendet (s.u. 2.9.) Mit einer Minipräparation nach Horowicz (s.u. 2.10.) wurden die re-

sistenten Kolonien auf Plasmide mit eingebauten HBV Sequenzen untersucht. HBV-positive Plasmide ließen sich sehr einfach durch Verdau mit dem RE HpaI finden, ein Enzym, das nur in HBV, nicht aber in Polyoma und pBR 322 schneidet. Im Gegensatz zu ungeschnittenen Plasmiden, die in der Regel zwei Banden im Gel zeigen (o.c. Form und c.c. Form(20)), sollte eine einzige Bande entstehen. In Abb. 17 sind das die Klone 14 (Spur 2) und 17 (Spur 3). Daneben, Spur 4 und 5, zum Vergleich die unverdauten Plasmide und in Spur 1 ein MG-Marker, dessen größte Bande 14 000 bp repräsentiert. Nun war noch zu eruieren, wie das HBsAg Gen im Polyoma-pBR 322 orientiert ist. In diesem Falle war das sehr einfach durch einen BamHI-Verdau zu erzielen. Das gesamte Plasmid wird dadurch in vier distinkte Bruchstücke geteilt, wobei, entsprechend der Orientierung, das kleinste und das größte Stück variieren und die beiden mittleren Stücke konstant bleiben. Ist die Pre_s-Region zum Origin of Replication des Polyoma Virus gerichtet (s. Abb. 13), sind Bruchstücke von 5753bp, 4362 bp, 1350bp und 959 bp zu erwarten. Bei umgekehrter Orientierung ergäbe der Verdau Bruchstücke von 5473 bp, 4362bp, 1350 bp und 1248 bp. In Abb. 18 ist in Spur 1 der MG Marker aufgetragen, in Spur 2 das Plasmid PHB_sII17 nach BamHI Verdau (vergl. auch Abb. 17). Die Bande des kleinsten BamHI Bruchstückes liegt eindeutig unter der 1060 bp Bande des MG Markers. Folglich enthält das Plasmid PHB_sII17 das HBV Fragment in der gewünschten Orientierung.

3.1.3. Integration des HBV BamHI Fragmentes (HBsAg) in das Polyoma Virus Genom des Plasmids PYD3 (s. Abb. 19)

Die der Konstruktion dieses Plasmids zu Grunde liegende Absicht war, den eigenen Promotor des HBsAg Gens durch den Promotor für die späten Polyoma Proteine zu ersetzen. Die Expression des HBsAg Gens würde somit unter Kontrolle eines fremden Promotors stattfinden. Mit einem SV 40 Vektor ist dies schon erfolgreich durchgeführt worden (77). Jedoch wurde der Vektor nicht zur Transformation von Zellen, sondern zur Expression von HBsAg produzierenden SV 40 Viren benutzt. Aus dieser Arbeit

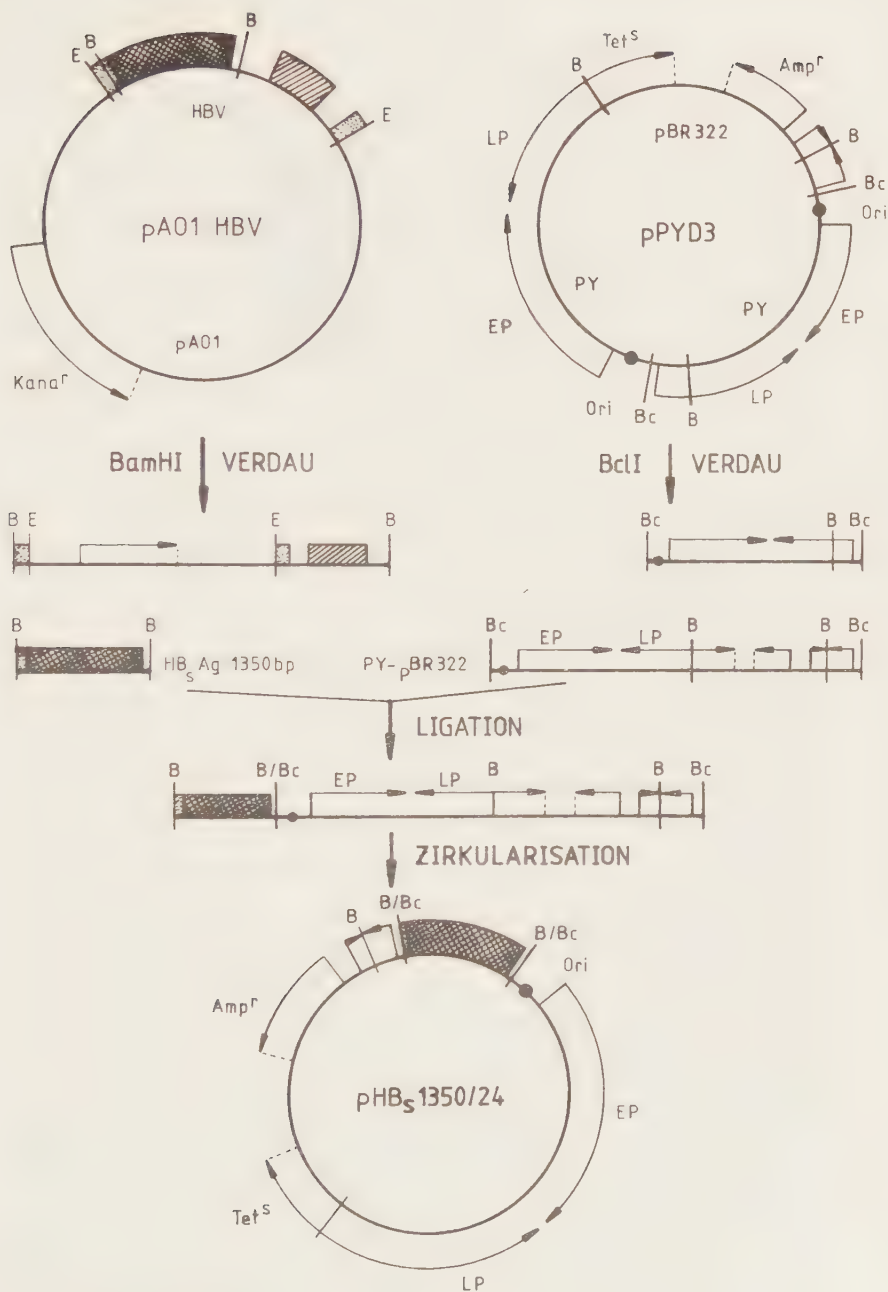


Abb. 19: B = BamHI, Bc = BclI, E = EcoRI, Ori = Origin of replication, PY = Polyoma Virus DNA, EP = Polyoma "early protein", LP = Polyoma "late protein", Amp^r = Ampicillin Resistenz, Tet^S = zerstörte Tetracyclin Resistenz

ist auch bekannt, daß hierzu neben dem HBsAg Gen Promotor auch auf die Pre_s-Region verzichtet werden kann (s. Abb. 3). Mit dem RE BamHI kann aus der HBV DNA ein 1350 bp Fragment isoliert werden, das nur codierende Sequenzen für das HBsAg enthält, dem also Promotor und Pre_s-Region fehlen. Wie schon unter Nr. 3.1.2. angeführt, liefert das RE BamHI die gleichen überstehenden Enden wie das RE BclI bei Verlust der Erkennungssequenz für beide Enzyme. Somit ist es sehr einfach, das 1350 bp HBV-Fragment, das durch BamHI Verdau aus dem Plasmid HBT 119 gewonnen wurde, in die BclI Stelle des Polyoma Genoms, wie für pPHB_sII17 beschrieben, zu inserieren. Bei dieser Konstruktion gewinnt die Frage der Orientierung des HBV-Fragments grundlegende Bedeutung. Das Gen muß, um überhaupt ein Genprodukt hervorbringen zu können, so hinter den Polyoma Promotor inseriert werden, daß es in der den späten Polyoma Protein Genen eigenen Leserichtung von den Polymerasen durchlaufen werden kann.

Ein Doppelverdau mit den RE HpaI und KpnI, wovon das erste im HBsAg Gen einmal schneidet und das zweite im Polyoma Genom zweimal schneidet, läßt die Orientierung des HBV Fragments sehr exakt erkennen. Die hierbei entstehenden drei Spaltstücke haben, im geforderten Arrangement des neuen Plasmids (s. Abb. 19), Größen von 6879bp, 3407 bp und 718 bp. Im umgekehrten Falle haben sie Größen von 6879 bp, 2837 bp und 1288 bp.

Da im Vergleich zum pHB_sII17 nur das HBV Insert geändert werden sollte, konnte aus dem gleichen BclI Verdau des PY D3 Vektors ein 1 µg Aliquot für die Ligation des neu zu konstruierenden Plasmids eingesetzt werden. Das HBV Fragment wurde dem Plasmid pHBT 119 entnommen (s. Abb. 20). Von den eingesetzten 30 µg pHBT 119 DNA blieben als BamHI Fragment für die Ligation mit dem Vektor nur mehr ca. 1 µg DNA übrig. 7/8 der DNA wurden durch den Verdau abgetrennt und vom Rest mußte noch ein Drittel für Verluste bei Trennungs- und Reinigungsschritten abgezogen werden. Somit lag für den Vektor ein j/i Verhältnis von 0,02 vor, für das HBV Fragment ein j/i Verhältnis von 0,46, beides gute Verhältnisse für Ketten-

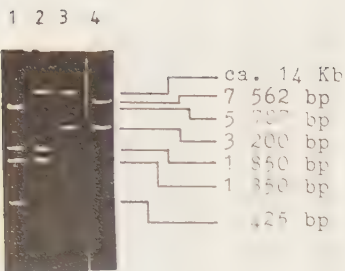


Abb. 20: BamHI Verdau des pHBT119 zur Isolierung des 1 350 bp HBsAg Fragmentes.

84 U BamHI wurden mit 30 µg DNA in 300 µl 100 mM NaCl Reaktionspuffer 3 Std inkubiert. Ein 1 µg Aliquot wurde auf ein 1% Agarose Slab-Gel aufgetragen (Spur 1). In Spur 2 pAO1-HBV BamHI/EcoRI geschnitten, in Spur 3 pAO1-HBV EcoRI - und in Spur 4 pHBT119 HpaI geschnitten, jeweils zum Vergleich. Laufzeit 4 Std bei 50 V, sonstige Bedingungen wie in Abb. 6.

bildung. Nach Ligation in einem Volumen von 10 µl wurde der Ansatz durch Puffer und ATP Zugabe auf 1 ml vergrößert, um Ringbildung zu ermöglichen.

Die j/i Verhältnisse errechneten sich hierbei auf die neuen Werte von 45,6 für das 1350 bp Fragment und auf 1,9 für das neu entstandene Plasmid, unter der Voraussetzung, daß von je 1 µg DNA und dem gemeinsamen i, wie vor der Ligation, ausgegangen wird. Dies wurde der Einfachheit halber angenommen, obwohl sich die DNA Konzentration der Einzelteile verringert hat zu Gunsten von neuen Kettenmolekülen, deren exakter Anteil aber nicht abzuschätzen ist. Deshalb wurden die Bedingungen für das gewünschte Plasmid kalkuliert, im Gegensatz zum kleinsten Fragment, um den Spielraum, in dem Ringbildungen möglich sind, in etwa auszuloten. Ein j/i Verhältnis von 1,9 für ein 1 µg Plasmid genügt für Zirkularisationen, zumal sich durch die Ligation der Anteil der für Kettenbildung zur Verfügung stehenden Enden i erheblich verringert. Der in der Be-

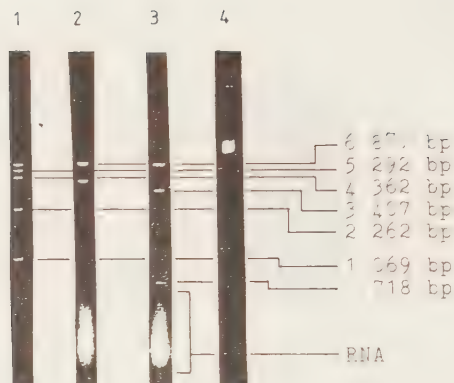


Abb. 21: RE-Verdau zur Ermittlung der Orientierung des 1 350 bp HBsAg Fragments im Plasmid PHBs1350/24.

Die Plasmid DNA wurde in Minipröp. nach Horowicz isoliert. Zum Verdau mit KpnI (Spur 2) und Doppelverdau mit KpnI/HpaI (Spur 3) wurde jeweils 1/3 der isolierten DNA in 7 µl Vol. eingesetzt. Bedingungen wie beschrieben. Das restliche 1/3 der DNA wurde unverdaut in Spur 4 aufgetragen. In Spur 1 lief ein MG Marker. Laufzeit 30 min bei 100 V in 1% Agarose Minigel. Sonstige Bedingungen wie in Abb. 6 .

rechnung eingesetzte i-Wert der unligierten Stücke dürfte um ein Vielfaches zu hoch liegen, so daß in der Realität ein Wert über 2 angenommen werden kann.

Nach Bakterientransformation entsprechend der unter Nr. 2.9. genannten Methoden und Präparation der Plasmide der resistent gewordenen Klone nach der Methode von Horowicz, wurden durch Verdau mit dem RE HpaI die Klone ermittelt, die HBV Sequenzen enthielten. Durch anschließenden Doppelverdau mit HpaI und KpnI konnte die richtige Orientierung festgestellt werden. Falls die Orientierung der gewünschten Konstruktion entspricht, müßte dieser Verdau Fragmente von 6879 bp, 3407 bp und 718 bp ergeben. Im anderen Fall sollte derselbe Verdau zu Fragmenten von 6879 bp, 2837 bp und 1288 pb führen. Diese Größenunterschiede lassen sich sehr leicht nach einem Trennungslauf im 1% Agarose-Gel erkennen. In Abb. 21 Spur 2 ist

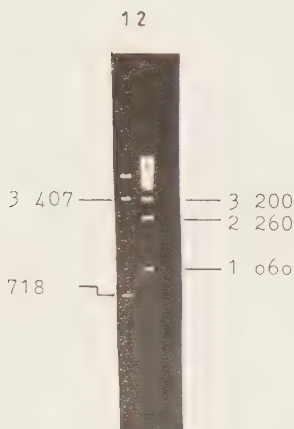


Abb. 22: HpaI/KpnI Doppelverdau des Plásmids PHBs1350/24 nach Massenkultur und Reinigung.

Verdaut wurden 0,5 µg DNA in 7 µl Reaktionspuffer unter beschriebenen Konditionen (Spur 1). Der ganze Ansatz wurde auf ein 1% Agarose Minigel aufgetragen. In Spur 2 lief ein MG Marker. Elektrophoresebedingungen wie in Abb. 21.

neben dem MG-Marker in Spur 1 das Plasmid nach KpnI Verdau aufgetragen, was zwei Banden ergibt. Daneben in Spur 3 ist das selbe Plasmid nach Doppelverdau mit KpnI und HpaI aufgetragen, wodurch die untere Bande (kleineres Fragment) in zwei Stücke zerteilt wird. Der kleinere Anteil von 718 bp läuft direkt oberhalb der RNA und bleibt eindeutig unter der 1000 bp Bande des MG-Markers. Zum Vergleich wurde das ungeschnittene Plasmid in Spur 4 aufgetragen. Abb. 22 zeigt das gleiche Plasmid, ebenfalls nach HpaI und KpnI Doppelverdau, nachdem es in einer Massenkultur vermehrt und über einen CsCl-Gleigewichtsdichtegradienten gereinigt worden ist. Hier (Spur 1) fehlt die RNA und, auf Grund der Bereicherung des MG-Markers um eine 3200 bp Bande, ist auch gut zu erkennen, daß die 3407 bp Bande des Plasmids oberhalb dieser Referenz liegt. Bei umgekehrter Orientierung läge sie unterhalb dieser Referenz, d.h. bei 2837 bp. Demnach entspricht das untersuchte Plasmid der gewünschten Konstruktion.

3.2. HBsAg Expression in Zellkultur

3.2.1. Transiente Expression in den Zelllinien NIH 3T3 Maus-fibroblasten und Fisher Rat-1 Fibroblasten.

Die Transfektion der Plasmide in NIH 3T3 Mausfibroblasten und Fisher Rat-1 Fibroblasten wurde jeweils wie unter Nr. 2.11.1. und 2.11.2. beschrieben mit der CaPO_4 Technik durchgeführt. Bei jedem Mediumwechsel wurde 1 Aliquot von 200 μl Medium für einen RIA nach Abbot entnommen. Als positiv wurden RIA Werte angenommen, die den Negativwert, abzüglich Leerwert, um den Faktor 2,1 übertrafen. Abb. 23 zeigt eine typische Verlaufskurve der transienten HBsAg Produktion nach der Transfektion des Plasmids PHBsII17 und als Kontrolle des pHBT 119 sowie H+B/8, welches das gleiche HBV Fragment in einem Papilloma Virus Vektor enthält (138). Identisch ist bei den Vektorplasmiden PHBsII17 und H+B/8 der Peak der Transienten HBsAg Produktion am siebten Tag post transfectionem in NIH 3T3-Mausfibroblasten. Von etwa gleicher Höhe fällt die Produktion verschieden schnell wieder ab und wird bei dem Plasmid PHBsII17 zwischen dem 10. und 13. Tag post transfectionem wieder negativ, während die Produktion bei dem Papilloma Vektor Plasmid ebenso wie bei dem HBV-Tandem Plasmid noch längere Zeit persistiert. In der Regel steigt nach vier Wochen, ausgenommen bei dem Plasmid HBT 119, die HBsAg Produktion erneut an, wobei gleichzeitig erste Foci transformierter Zellklone sichtbar werden. In Abb. 23 ist nur die Expressionsrate des H+B/8 so lange aufgetragen, daß der Anstieg der Expression durch transformierte Zellklone sichtbar wird, als Vergleich zum Expressionsprofil des HBT 119.

Demgegenüber zeigten Rattenzellen keinerlei transiente Expression, weder nach Transfektion mit dem Plasmid PHBsII17 noch mit dem zur Kontrolle benutzten Plasmid H+B/8. Parallel zu diesen Versuchen wurde auch das Plasmid PHBs1350/24 (s. Abb. 19) nach der Transfektion in NIH 3T3-Mausfibroblasten und Fisher Rat-1 Fibroblasten auf transiente Expression untersucht, aber in keiner der beiden Zelllinien konnte HBsAg Produktion gemessen werden. Lediglich in primären Mauszellkulturen, aus Mausembryonen gewonnen, wurde sowohl mit dem Plasmid PHBsII17 als auch mit dem Plasmid PHBs1350/24 niedrige transiente Expression innerhalb von zwei Tagen erreicht.

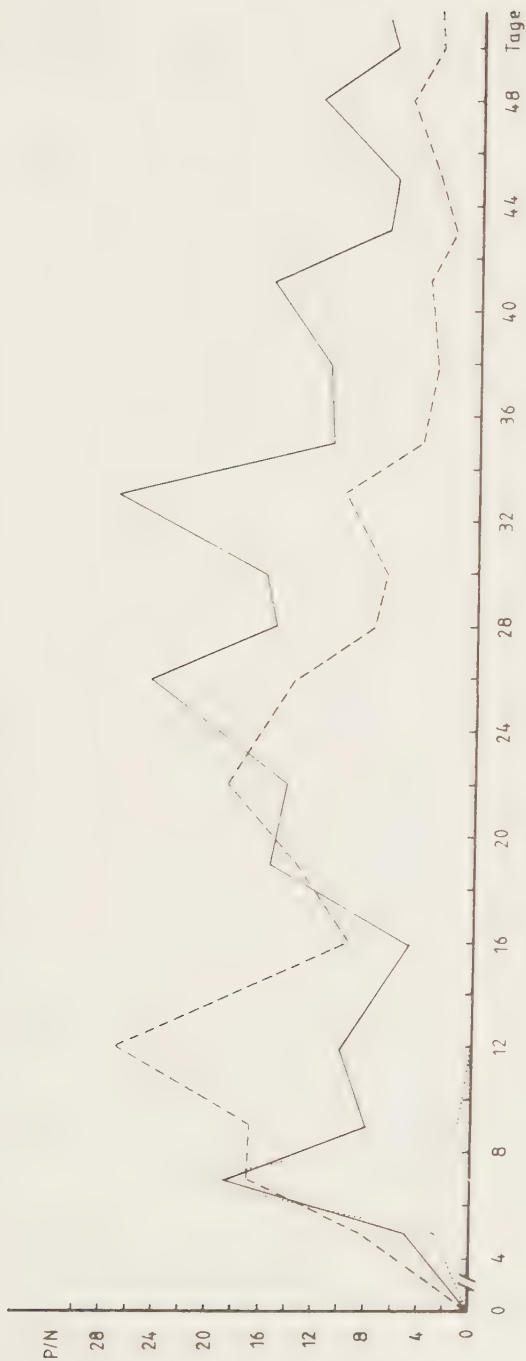


Abb. 23: Transfektion von NIH 3T3 Mausfibroblasten mit den Plasmiden PHBsII17 (.....), HBT119 (-----) und H+B/8 (—).

Jeweils 5 µg Plasmid DNA wurden in 500 µl HBS Puffer mit $0,125$ M CaCl_2 und 10 µg Kalbsthymus DNA als Carrier nach 20 min Inkubation auf 1×10^5 Zellen in $2,5$ ml DMEM Nährmedium gegeben und 14 Std bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Danach wurde mehrfach mit DMEM gewaschen. Der darauffolgende Tag wurde als $1.$ Tag nach Transfektion gerechnet. Zur Messung der HBsAg Produktion wurden bei jedem Mediumwechsel 200 µl Medium entnommen und im Radioimmunoassay AuSRRIA von Abbot Industries getestet. Auf der Ordinate ist der P/N Wert als Quotient aus dem gemessenen RIA Wert in Counts/min und dem Durchschnittswert von 4 RIA Negativkontrollen aufgetragen. Das Wiedereintreten der permanenten Expression des pPHBsII17 ist nicht dargestellt.

3.2.2. Permanente Expression von HBsAg nach Cotransfektion mit dem Resistenzgenplasmid AG60.

Transfektionen des Plasmids HBT119 in Maus- oder Rattenfibroblasten zeigen, wie unter Nr. 3.2.1. dargestellt, nur transiente HBsAg Expression, da ein Selektionsmarker fehlt. Um trotzdem eine permanente Expression zu ermöglichen und dabei auch andere HBV Antigene, z.B. HBe- und HBcAg zu finden, wurden Cotransfektionen mit dem Resistenzgenplasmid AG60 durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Abb. 24, in der die Expressionsraten zweier Transfektionen gemittelt wurden. Nach nur schwacher transienter Expression -im Gegensatz zuralleinigen Transfektion des HBV Tandems- und langer Phase ohne Expression, steigt die HBsAg Expression relativ hoch an und verbleibt auf diesem Level. Die niedrige transiente Expression kann nur zu einem geringen Teil dadurch verursacht sein, daß im Transfektionsansatz bei gleicher Gesamtplasmidmenge (5 µg) nur 90% HBV Tandemplasmid- bei 10% Resistenzgenplasmidanteil enthalten war. Entscheidend dürfte sein, daß am 3. Tag nach der Transfektion durch Zugabe von G418, einem Kanamycinderivat, mit der Selektion der resistent gewordenen Zellen begonnen wurde. Dadurch wurden alle Zellen vernichtet, die kein Resistenzgenplasmid aufgenommen hatten, auch solche, die nur das HBV Tandemplasmid enthielten und zur transienten Expression beitrugen. Da nur 10% der transfektierten DNA aus Resistenzgenplasmid bestand, mußte die Zahl der resistenten Zellen, die die Selektion mit G418 überlebten, sehr gering sein, weshalb der erneute Anstieg der HBsAg Expression aus resistenten Zellklonen stark verzögert wurde. Nur der Teil der resistenten Klone exprimierte auch HBsAg, der sowohl das Plasmid AG60, als auch das Plasmid HBT119 aufgenommen und integriert hatte, wie eine Vereinzelung verschiedener Klone mit der Klonierringtechnik ergab. Die in Abb. 24 dargestellten Werte sind jedoch vor der Klonentnahme aus den Urplatten ermittelt und entsprechen in ihren höchsten Werten den Expressionsraten bei Konfluenz der Klone zum Monolayer.

Andere Antigene als HBsAg wurden nicht gemessen, da hierzu die Zellklone erst zu höheren Zellzahlen herangezüchtet und die Antigene durch Zellaufschluß und Mediumkonzentration gewonnen werden müßten.



Abb. 24: Cotransfektion von pHT119 und pAG60 in NIH 3T3 Mausfibroblasten

5 µg Plasmid DNA (4,5 µg HBT119 + 0,5 µg pAG60) wurden mit 10 µg KT DNA in 500 µl HBS Puffer mit 0,125 M CaCl₂ gelöst und nach 20 min Inkubation auf 1×10^5 Zellen in 2,5 ml DMEM Nährmedium gegeben. Nach 14 Std. Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde mehrfach mit Medium gewaschen. Am 3. Tag nach Transfektion wurde 5 mg G418 zu 10 ml Medium gegeben und mit jedem Mediumwechsel erneuert. Die HBsAg Messung erfolgte wie in Abb. 23 angegeben.

3.2.3. Permanente Expression von HBsAg in transformierten Zellen.

Zwei grundsätzlich verschiedene Methoden kamen für die Selektion von transformierten, HBsAg produzierenden, klonalen Zelllinien in Frage. Zum einen die unter Nr. 2.11.3. beschriebene Methode der Weichagar Selektion, zum anderen die direkte Entnahme der den Zellmonolayer überwachsenden Foci transformierter Zellen (s.u. 2.11.4.). Jede Methode differenziert auf Grund verschiedener Merkmalsunterschiede zwischen transformierten und nicht transformierten Zellen. Ist es bei der Weichagar Selektion hauptsächlich eine differente Stoffwechselleistung, die es den transformierten Zellen, im Gegensatz zu den untransformierten Zellen, ermöglicht in Agar zu wachsen und große Zellklone zu bilden (s. Abb. 25), so ist es bei der Focusisolation die unterschiedliche Morphe der malignen Zellen und deren verlorengegangene Kontaktinhibition, die als Selektionsmarker dient (s. Abb. 26). Die Weichagar Selektion hat den Vorteil, daß die Klone, vorausgesetzt bei der Entnahme aus dem Agar

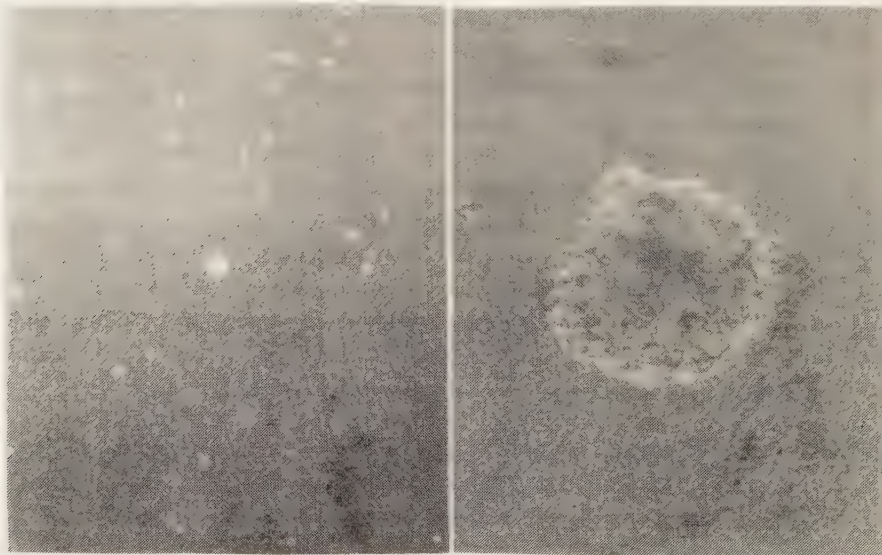


Abb. 25a und 25b: Klone transformierter Zellen in Weichagar
ca. 14 Tage nach Einbettung.

25a: Vergr. 40 fach; 25b: Vergr. 200 fach

werden keine benachbarten Zellen mitgenommen, nicht mit untransformierten Zellen kontaminiert sind. Eine weitere Selektion erübrigt sich hierdurch.

Mehr als 50 Klone wurden insgesamt isoliert, von denen die meisten HBsAg produzierten, mit jedoch sehr unterschiedlicher Effizienz. Wie bei der transienten Expression waren auch hier Zelltyp- und plasmidspezifische Unterschiede festzustellen. Wie in Abb. 27 dargestellt, wurden die höchsten Produktionsraten mit dem Plasmid PHB_S II17 in NIH 3T3 Mausfibroblasten (Klon A₂) erzielt. Erheblich weniger produzierten Fisher Rat-1 Fibroblasten, mit dem gleichen Plasmid transformiert (Klon R₉) und noch weniger, Fisher Rat-1 Fibroblasten, mit dem Plasmid PHB_S 1350/24 transformiert. Mit dem Plasmid PHB_S 1350/24 konnten keine HBsAg produzierende NIH 3T3 Mausfibroblastenklone isoliert werden.

Um die HBsAg Produktion quantitativ abschätzen zu können, wurden drei verschiedene Populationen des Klones A₂ in einer Produktionskinetik mit der etablierten, HBsAg produzierenden humanen Tumorzelllinie HPL PLC/5 Alexander (70) verglichen. Die

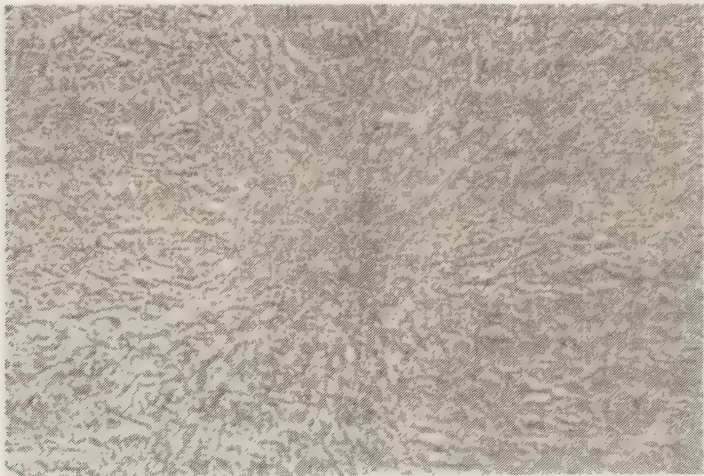


Abb. 26: Focus transformierter Zellen, ca. 5 Wochen nach Transfektion, den Zellmonolayer in der Kulturschale überwachsend. Vergr. 200 fach

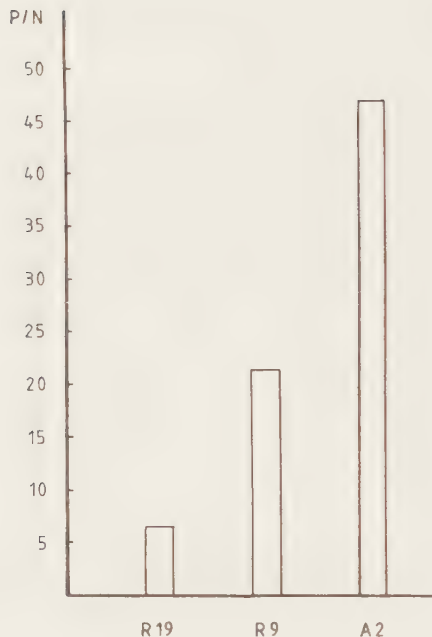


Abb. 27: Im Radioimmunassay AUSRIA von Abbot gemessene Werte der HBsAg Produktion verschiedener plasmidtransformierter Zellklone, jeweils bei Konfluenz des Zellmonolayers und gleicher Mediummenge. R19 = Plasmid PHBs1350/24 in Fisher Rat 1 Fibroblasten, R9 = Plasmid PHBsII17 in Fisher Rat 1 Fibroblasten, A2 = Plasmid PHBsII17 in NIH 3T3 Mausfibroblasten. P/N = Quotient aus dem gemessenen RIA Wert in Counts/min und dem Durchschnittswert von 4 RIA Negativkontrollen.

Ergebnisse zeigt Abb. 28, in welcher der P/N RIA-Wert, Zellzahl und Volumen bezogen, aufgetragen ist. Im Schnitt ist der P/N Wert je Zelle und Volumeneinheit bei dem Klon A2 doppelt so hoch wie bei der Alexander Zelllinie.

Diese Ergebnisse zeigen, daß mit dem Plasmid PHBsII17 und der Zelllinie NIH 3T3 Mausfibroblasten ein effizientes, HBsAg produzierendes System vorliegt, das der Alexander Zelllinie überlegen ist. Die geringere Effizienz des gleichen Plasmids in Fisher Rat-1 Fibroblasten kann wahrscheinlich auf die geringere Permissivität der Zellen für den viralen Vektor zurückgeführt werden.

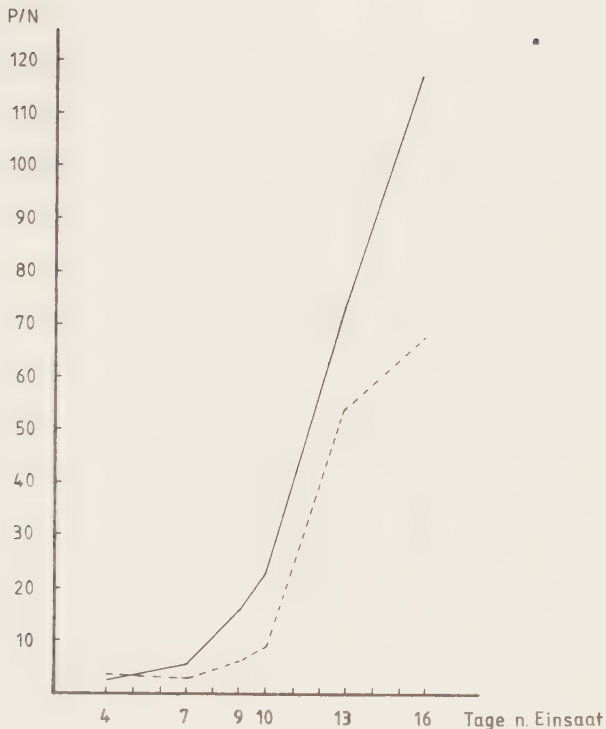


Abb. 28: HBsAg Produktionskinetik von drei Populationen (Durchschnittswerte) des Klones A2 (pPHBsII17 in NIH 3T3 Mausfibroblasten)_____ und der humanen Tumorzelllinie PHL PLC/5 Alexander-----.

Die Zellen des Klones A2 wurden 14 Tage vor Beginn der Messungen bei 0,5% FCS im Nährmedium gehalten. Am Tage 0 wurde das FCS, bei einer Einsaat von 1×10^5 Zellen, auf 10% erhöht. Aufgetragen ist der Quotient aus dem im Radioimmunassay AUSRIA gemessenen Wert P und den Negativkontrollen N gegen den Meßtag nach der Einsaat. Die Zellzahlen wurden bei der Einsaat und am 16. Tag nach Einsaat festgestellt. Die Menge des Kulturmediums wurde bei jeder Messung bestimmt. Alle Werte sind auf ein Mediumvolumen von 4,6 ml und der Wert vom 16. Tag ist zusätzlich auf 3×10^6 Zellen bezogen.

4. Diskussion

Die in der Arbeit beschriebenen Plasmidkonstruktionen stellen grundsätzliche Klonierungsarbeiten dar, mit denen ein Beitrag für Genexpressionsstudien in vitro und in vivo geleistet werden sollte. Nach Abschluß der wichtigsten Klonierungsarbeiten konnten entscheidende Experimente zur Genexpression durchgeführt werden, mit denen die prinzipielle Funktionsfähigkeit der Plasmide und die theoretische Richtigkeit der Konstruktionen bewiesen werden konnten. Mit den gewählten Plasmidkonstruktionen wurden einerseits Untersuchungen zur Virusreplikation und zur potentiell tumorigenen Wirkung der HBV-DNA, andererseits Untersuchungen zur in vitro und in vivo Expression des HBsAg unter einem viralen Vektor (Polyoma Virus-DNA) als Weg zur molekularbiologischen Impfstoffherstellung ermöglicht.

Mit dem Plasmid HBT119, das zwei HBV-DNA Moleküle in Kopf-zu-Schwanz Tandemformation in einem Plasmid BR322 trägt, sollten die tumorigenen Eigenschaften der HBV-DNA untersucht und eine Expression von HBcAg und HBsAg angestrebt werden.

Über einen tumorinduzierenden Mechanismus des HBV ist nichts bekannt außer, daß eine hohe statistische Korrelation zwischen dem Auftreten von HBV Infektionen und primärem Leberzellkarzinom besteht, in verschiedenen primären Leberzellkarzinomen integrierte HBV-DNA gefunden wurde und in einigen der untersuchten Karzinomen HBsAg exprimiert wurde (13,15,17,54, 58,70). Die experimentelle Induktion einer malignen Zelltransformation durch HBV oder HBV-DNA ist bisher nicht gelungen, obwohl die Integration der DNA - bei den meisten Tumoviren essentielle Voraussetzung für die Transformation - in das Wirtszellgenom keine Schwierigkeiten bereitet. Man nimmt deshalb an, daß entweder das geeignete Wirtszellsystem (humane Hepatozytenkulturen), in dem potentiell tumorigene HBV-Genprodukte gebildet werden können, fehlt, oder daß primäre Leberzellkarzinome nicht durch HBV-Genprodukte, sondern durch DNA-DNA Interaktion induziert werden. Generell können durch DNA Integration in die Zell-DNA zufällig zellu-

läre Oncogene aktiviert werden, welche die Zellen selbst transformieren (101,87) - ein Mechanismus, der im Prinzip mit jeder beliebigen zellulären DNA durch Transfektion mit geringer Wahrscheinlichkeit zu induzieren ist (25). Nimmt man an, daß die HBV-DNA eine erhöhte Integrationsfähigkeit hat, kann die Wahrscheinlichkeit der zufällig induzierten Zelltransformation durch Oncogenaktivierung erheblich ansteigen. So liegen z.B. auf der der HBV-DNA eng verwandten WHV-DNA (Woodchuck Hepatitis Virus) Sequenzen, die für eine Wirtsgen aktivierende Eigenschaft in Frage kommen (89).

In den Transfektionsexperimenten mit dem Plasmid HBT119 wurden gewisse Hinweise für eine starke integrative Aktivität der HBV-DNA gefunden. Wie in Abb. 24 zu sehen ist, steigt die transiente HBsAg Expression in NIH 3T3 Mausfibroblasten nach Transfektion mit dem Plasmid HBT119 im Vergleich zu den Referenzplasmiden H+B/8 (Papilloma Virus Vektor) und PHBsII17 (Polyoma Virus Vektor) wesentlich langsamer an. Nach Erreichen des Peakwertes (12.-16. Tag, gegenüber 7. Tag bei den Referenzplasmiden) kommt es nach initialem Abfall um ca. 50% des Peakwertes nur noch zu einem langsamen Absinken der Expressionsrate, entsprechend der exponentiellen Sterberate der Zellen. Demgegenüber fiel die Expression des HBsAg mit dem Plasmid PHBsII17 am 9. Tag nach der Transfektion auf nicht mehr meßbare Werte ab und stieg erst nach 4 Wochen mit dem Erscheinen von transformierten Zellen erneut an. Die HBsAg Expression des Plasmids H+B/8 zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die des Plasmids PHBsII17, jedoch mit konstant positiven Expressionsraten aus transformierten Zellen. Transformierte Zellen und damit verbunden erneuter Anstieg der HBsAg Produktion konnten bei den mit dem Plasmid HBT119 transfektierten Zellen nicht beobachtet werden. Die Unterschiede der HBsAg Produktion der verschiedenen Plasmide waren auch bei wiederholter Transfektion qualitativ feststellbar. Somit zeigen die beiden Vektorplasmide H+B/8 und PHBsII17 sehr ähnliche Expressionsprofile, von denen das HBV Tandemplasmid erheblich abweicht. Insbesondere der verspätete Anstieg und der verzögerte Abfall nach dem Peak der transienten Expression des HBV Tandemplasmids, im Vergleich zu den Vektorplasmiden

den, ist als Hinweis auf unterschiedliche Virus DNA - Zell DNA Interaktionen mit dem Resultat einer erhöhten Integrationsfähigkeit der HBV-DNA zu werten.

Soweit bekannt, kommt es nach Transfektion von Polyoma Virus-DNA in Zellen zur transienten Expression viraler Gene im Zytoplasma. Ein nur geringer Teil dieser DNA gelangt von hier in den Zellkern, kann dort in die Wirts-DNA integrieren und dadurch stabil Fremdgene exprimieren. Bezogen auf das Plasmid PHBsII17 mit Polyoma Virus Vektor und HBsAg Gen bedeutet dies, daß, nach initialer HBsAg Expression im Zytoplasma kurz nach Transfektion, ein Abfall der HBsAg Expression durch Abbau der Plasmidmoleküle eintritt, von denen nur wenige den Zellkern penetrieren und in die Wirts-DNA integrieren. Die Genexpression steigt erst wieder auf meßbare Werte an, nachdem einige durch Polyoma Genprodukte transformierte Zellen zu großen Klonen herangewachsen sind. Anders verhält sich der Papilloma Virus Vektor im Plasmid H+B/8. Nach transienter Expression im Zytoplasma (Peak) kommt es zur selbständigen Replikation der DNA und damit zur Amplifikation im Zellkern ohne Integration in die Wirts-DNA (60). Bis zum Erscheinen transformierter Zellkone und damit verbunden Expressionsanstieg, bleibt deshalb eine relativ hohe Expressionsrate meßbar.

Das andere HBsAg Expressionsprofil des pHBT119, ist mit einer erhöhten Integrationsrate, ohne transformierende Eigenschaften der DNA, gut zu erklären. Falls sofort nach Transfektion ein hoher Prozentsatz der Moleküle in die Wirtszell-DNA integriert wird, fällt dieser Anteil für die zytoplasmatische transiente Expression aus (langsamer Anstieg). Die stabile und hohe Expression nach abgeschlossenem DNA-Rearrangement der Wirtszelle addiert sich kurzfristig mit der schon sinkenden transienten Expressionsrate (verspäteter Peak) und sinkt dann langsam, entsprechend der Sterberate der Zellen, exponentiell ab. Ein erneuter Anstieg erfolgt nicht, da keine transformierten Zellen induziert werden. Bemerkenswert ist dieses beobachtete Verhalten der HBV-DNA, wenn man bedenkt, daß das als Vergleich dienende Tumovirus Polyoma ein sehr integrationsstarker Vektor ist. mit seinem "large T-Protein"

(Tumorprotein) besitzt das Polyoma Virus ein Genprodukt, das die Integration der Virus-DNA in das Wirtszellgenom aktiv steuert. Etwas ähnliches ist für das HBV nicht bekannt, wenn- gleich noch nicht alle potentiellen Genprodukte charakteri- siert sind. Es existieren jedoch Hinweise darauf, daß die flankierenden Sequenzen integrationsfähiger viraler DNA gleich sein müssen, um eine gute Integrationsfähigkeit zu erzielen (22,28,56,104). Dies trifft für die LTRs der RNA Retroviren (56,104) zu und wird bei den DNA Tumoviren (Po- lyoma, SV 40) durch identische Reduplikation vor der Inte- gration erreicht. Hierbei wird ein DNA Kopf-zu-Schwanz Tan- dem gebildet, auf dem alle Sequenzen doppelt vorhanden sind. Dadurch können diese DNA-Tumoviren auf Grund der Duplizi- tät der Sequenzen mit beliebigen DNA-Stücken - von gleichen Sequenzen begrenzt - in die Wirts-DNA integrieren (22,28). Möglicherweise ist das beobachtete Verhalten der HBV-DNA im Plasmid HBT119 auf Mechanismen zurückzuführen, in denen die Tandemformation mit der Sequenzduplizität die entscheidende Rolle bei der hohen Integrationsrate spielt. Um Anhaltspunk- te dafür zu gewinnen, ob die integrative Fähigkeit der HBV- DNA im pHBT119 mit der vermuteten Tumorigenität des HBV im Zusammenhang steht, wurden Transfektionen des Plasmids in NIH 3T3 Mausfibroblastenkulturen durchgeführt, die mit TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetat) und Griseofulvin, sog. Tumorpromotoren, vorinkubiert waren. Bei Polyoma Virus und Bovine Papilloma Virus wurde die transformierende Wirkung durch Inkubation der Wirtszellen mit o.g. Tumorpromotoren entscheidend verbessert (4,110). In den Experimenten mit der HBV-DNA wurden jedoch außer einer fraglichen Erhöhung der Integrationsrate keine Unterschiede zu unbehandelten Zell- kulturen festgestellt; insbesondere traten transformierte Zellklone nicht auf. Eine sichere Aussage hierzu könnte nach Durchführung zahlreicherer und strenger kontrollierter Ex- perimente getroffen werden.

Neben diesen Untersuchungen zur tumorigen Potenz der HBV- DNA bietet das Plasmid HBT119 auch Möglichkeiten, Gene des HBV zur Expression zu bringen, die bisher in Zellkultur kaum exprimiert wurden, aber Vorausbedingung einer Virusreplika-

tion in vitro wären. So zeigten Arbeiten von N.M. Gough und K. Murray (42), daß zur Expression des HBc- und HBeAg in Zellkultur wahrscheinlich mehr als ein einziges HBV-Genom notwendig ist. Die beiden Autoren nehmen an, daß die m-RNA der beiden Antigene aus einem Vorläufer gebildet wird, der größer ist als die Länge eines einzigen HBV-Genoms. Ein gewisser Hinweis darauf, daß solche, mehrere HBV-Genome beanspruchende m-RNAs zur Virusreplikation nötig sein könnten, liefert auch der Befund, daß im Serum von HBV Infizierten das HBsAg in großem Überschuß gegenüber den anderen Antigenen zirkuliert. Das HBsAg kann auch dann noch im Serum zirkulieren, wenn sonst kein Antigen mehr gefunden wird und keine Infektiosität mehr besteht (sog. chronische Träger). Eine Erklärung für den HBsAg Überschuß wäre mit den o.a. Befunden möglich: Nur wenige Virusgenome verbinden sich zu der für die HBc- und HBe m-RNA und damit für die Virusreplikation nötigen Tandemform, aber von fast allen Virusgenomen wird HBsAg exprimiert. Um einen solchen Mechanismus zu untersuchen, wurde eine Co-Transfektion mit dem Plasmid HBT119 und dem Resistenzgen Plasmid AG60 (23) in Fisher Rat 1- und NIH 3T3 Mausfibroblasten durchgeführt. Die Selektion der resistent gewordenen und HBsAg produzierenden Zellen erfolgte mit dem Kanamycinderivat G418 (23). In Abb. 24 ist die HBsAg Expression dieser Zellkulturen über eine mehrwöchige Periode dargestellt. Am 40. Tag nach der Transfektion steigt die HBsAg Expression nach transienter Expression und initialem Abfall erneut an, als Zeichen für das Auftreten resistenter Zellklone. Messungen, das HBc- und HBeAg betreffend, wurden nicht durchgeführt, da, um meßbare Werte zu erhalten, sicher große Zellzahlen und evtl. Immunfluoreszenztechniken zum qualitativen Nachweis nötig wären. Ferner müßte mit der Southern-Blotting Technik der Status der integrierten HBV Sequenzen in den Wirtszellen bestimmt werden, um eine Aussage zu dem oben genannten Mechanismus treffen zu können. Als Weiterführung der Experimente zur Untersuchung der viralen Replikation war die Einschleusung des pHBT119 in humane Hepatozyten geplant, deren in vitro Kultivierung am Institut bis zu 30 Tagen gelang. Mehrere Transfektionen

mit der CaPO_4 -Technik (s.u. 2.11.2.) und der Liposomen Technik waren, auch bei Verwendung anderer Plasmide, erfolglos. Möglicherweise wären mit der Mikroinjektionstechnik bessere Erfolge zu erzielen gewesen, eine Methode, die jedoch nicht zur Verfügung stand.

Gegenüber der Klonierung zweier HBV Genome in Tandemformation im Plasmid HBT119 hatte die Klonierung einzelner Teile der HBV-DNA im Polyoma Virus Vektor zum einen den Zweck, die Funktion dieser Sequenzen näher zu charakterisieren, zum andern den Zweck, den Vektor selbst in seiner Eignung als Expressionsvektor in verschiedenen Wirtszellkulturen zu untersuchen. Letzteres war besonders interessant im Hinblick auf eine in vivo Anwendung des Vektors.

Einen in der Höhe nicht erwarteten Unterschied der HBsAg Expressionsraten zeigten die beiden in der Sequenzlänge verschiedenen HBV Fragmente in den Plasmiden PHBsII17 und PHBs-1350/24 trotz gleichen Vektors und gleicher Wirtszellen. Das 1350 bp Fragment im Plasmid PHBs1350/24 enthielt nur die kodierenden Sequenzen für das HBsAg und im Vergleich zum 2770 bp Fragment im Plasmid PHBsII17 keine Pre-S Sequenzen und keine eigenen Promotoren und Startsignale. Wie in Abb. 27 ersichtlich, erreichte der einzige HBsAg positive Klon (aus 20) des pPHBs1350/24 in Fisher Rat 1 Fibroblasten nur 1/3 der Expressionsrate des pPHBsII17 in den gleichen Zellen. Positive Klone des Plasmids PHBs1350/24 in NIH 3T3 Mausfibroblasten wurden nicht gefunden. Eine transiente Expression des pPHBs1350/25 war weder in NIH 3T3 Mausfibroblasten, noch in Fisher Rat 1 Fibroblasten festzustellen. Mögliche Ursachen der niedrigen Expressionsrate können sowohl die fehlende Pre-S Region oder fehlende Startsignale sein, als auch eine trotz Vorschaltung von Polyoma Promotoren nicht ausreichende Promotorfunktion. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen wurden in der Arbeit von Moriarty et al. von 1981 (77) mit dem gleichen HBV Fragment des gleichen HBV Serotyps im SV40 Vektor erheblich höhere Expressionsraten erzielt. Trotz ähnlicher DNA Konstruktion wurde aber ein Expressionssystem gewählt, mit dem in einer permissiven Zellkultur eine lytische Virus-

infektion mit Helferviren induziert wurde, ganz im Gegensatz zur hier gewählten Zelltransformation. Die Expression von Fremdgenen in einem lytischen Virus-Helfervirus System ist sehr effektiv, wenn auch nur kurzdauernd, und im Prinzip auch in vivo anwendbar. Dies ist auch ein Grund für die Konstruktion des pPHBs1350/24, das nach unwesentlichem Umbau in ähnlicher Art und Weise in vitro, aber auch in vivo zu verwenden wäre.

Die Konstruktion des Plasmids PHBsII17 ist dagegen auf sichere und hohe Expression des HBsAg angelegt. Sie sollte einen Vergleich verschiedener Vektoren erlauben und die Untersuchung verschiedener Wirtszelllinien bezüglich ihrer Eignung als Expressionssystem ermöglichen. Dem HBsAg sollte bei diesen Experimenten in erster Linie eine Markerfunktion für qualitative Expression zukommen, besonders im Hinblick auf spätere in vivo Versuche. Zum Vergleich der Expressionsraten können der BPV (Bovine Papilloma Virus) Vektor im Plasmid H+B/8 und der MSV (Maus Sarkom Virus) Vektor im Plasmid MSVHBs4 dienen, die von Herrn Stratowa (138) bzw. Herrn Döhmer (121) benutzt wurden. Beide genannten Vektoren enthalten das gleiche HBV Fragment wie der Polyoma Virus Vektor und kamen in der gleichen Zelllinie (NIH 3T3 Mausfibroblasten) nach Induktion von transformierten Zellklonen zur permanenten Expression. Im direkten Vergleich der transienten Expressionsrate, s. Abb. 23, konnten zwischen Polyoma- und Papilloma Virus Vektor keine Unterschiede festgestellt werden. Lediglich in der Zwischenphase zwischen transientser Expression und permanenter Expression aus Zellklonen zeigten sich Unterschiede, für die oben schon Erklärungsmöglichkeiten diskutiert wurden. Ein ähnlicher Mechanismus auf gleicher Grundlage dürfte auch für die differente Expressionsrate der beiden Vektoren aus transformierten Zellen verantwortlich sein. Während der Polyoma Virus Vektor im pPHBsII17 ca. das zweifache der als Referenz dienenden Expressionsrate der Alexanderzellen (HPL PLC/5), s. Abb. 28, erreicht, liegt die Expressionsrate des BPV Vektors im pH+B/8 20 mal so hoch. Ähnlich hohe Expressionsraten (20 x Alexanderzellen) erreicht auch der MSV Vektor. Die Unterschiede zwischen Polyoma- und Papilloma Vektor

sind gut durch den unterschiedlichen Transformationsmechanismus zu erklären. Während Polyoma Virus zur Transformation in die DNA der Wirtszelle integriert und dort meist als Einzelkopie mit der Wirtszell-DNA vermehrt wird, repliziert sich Bovine Papilloma Virus als episomale DNA außerhalb und unabhängig von der Wirtszell-DNA im Zellkern und liegt deshalb in vielen Kopien pro transformierte Wirtszelle vor. Ein weiterer Mechanismus, die Effizienz der Polyoma Virus DNA negativ beeinflussend, kommt noch hinzu, der auch den Unterschied zum MSV Vektor erklären könnte. Das den Integrationsvorgang bewirkende L-Tumorprotein des Polyoma Virus ist auch in der Lage, den umgekehrten Vorgang zu induzieren, d.h. in das Zellgenom integrierte Virus DNA wieder zu exzidieren und die Zellen als sog. Revertanten zu "heilen" (34,22,8). Ungeklärt bleiben jedoch die in etwa gleich hohen Expressionsraten von MSV- und BPV Vektor, da das MSV ähnlich wie Polyoma integriert, nicht aber wie BPV amplifiziert. Möglicherweise sind für die hohen MSV Expressionsraten die sog. Enhancersequenzen in den beiden LTRs verantwortlich, die je nach Anordnung sehr unterschiedliche Wirkungen entfalten können.

Ein ganz anderer Grund für die große Differenz zwischen den mit dem Polyoma Virus Vektor erzielten HBsAg Expressionsraten einerseits, und den mit dem MSV- und BPV Vektor erzielten HBsAg Expressionsraten andererseits, könnte in der unterschiedlichen Reinheit der Zellklone liegen, also rein experimentell technisch bedingt sein. Sicherlich sind die vom Polyoma Vektor induzierten Zellklone im Gegensatz zu den vom MSV- und BPV Vektor induzierten Zellklone immer mit untransformierten Zellen kontaminiert, da durch die Eigenschaften des L-Tumorproteins ständig Revertanten (s.o.) entstehen und so die Meßwerte verfälscht werden. Doch durch Reduktion des FCS im Kulturmedium auf 0,5% wird ein starker Selektionsdruck auf die Zellen ausgeübt, dem nur die Tumorzellen -allerdings auf Kosten der Wachstumsraten - widerstehen. Die Produktionskinetik in Abb. 28 wurde unter diesen Bedingungen durchgeführt, weshalb die gemessenen Expressionsraten als Optimum zu werten sind. In Abb. 28 ist weiterhin zu erkennen,

daß der Kurvenverlauf der HBsAg Produktion aus dem A2 Zellklon (Polyoma Vektor transformierte Zellen) in der exponentiellen Phase abbricht, während der der Alexanderzellen schon im Sättigungsbereich angelangt ist. Durch verspäteten Anstieg der Expression (verzögertes Wachstum durch Reduktion des FCS im Medium auf 0,5%) wurde die Messung relativ zu früh abgebrochen. Aus vorhergehenden Versuchen ohne FCS Reduktion kann jedoch angenommen werden, daß der Peak der Produktion das zweifache der Alexanderzelle nur unwesentlich übersteigen dürfte, also auch bei einem Anstieg auf das 5-fache immer noch weit unter den Raten der BPV- oder MSV Vektoren liegen dürfte. Die Unterschiede der Expressionsraten der verschiedenen Vektoren dürften deshalb eher auf o.g. molekularbiologisch genetische, als auf experimentell technische Ursachen zurückzuführen sein.

Die unterschiedlichen Expressionsraten des Plasmids PHBsII17 (Polyoma Vektor + 2770 bp HBsAg Gen Sequenzen) in den beiden verschiedenen Zelllinien (NIH 3T3 Mausfibroblasten und Fisher Rat 1 Fibroblasten, s. Abb. 27) entspricht im wesentlichen den Erwartungen und ist wohl auf unterschiedliche Permissivität der Zellen in Bezug auf den viralen Vektor zurückzuführen. Mausfibroblasten als permissive Zellen für das Polyoma Virus ermöglichen gute virale Replikation und Expression viraler Gene, nicht aber virusinduzierte Transformation. Rattenfibroblasten als semipermissive Zellen für das Polyoma Virus ermöglichen keine oder nur minimale Replikation der viralen DNA, werden aber in hohem Maße transformiert, unter Expression der Tumorgene des Virus. NIH 3T3 Mausfibroblasten zeigen als permanente Zelllinie noch eine hohe Permissivität (hohe Expressionsraten viraler Gene und mit dem Vektor eingebrachter Fremdgene), sind aber, selbst schon am Rande zur malignen Transformation stehend, auch leicht transformierbar. Fisher Rat 1 Fibroblasten zeigten demgegenüber keine transiente Expression und, bei guter Transformierbarkeit, nur niedrige permanente Expressionsraten der Transformanten.

Primäre Mauszellkulturen aus Mausembryonen, die als Voruntersuchung zur in vivo Anwendung mit dem pPHBsII17 transfektiert wurden, zeigten erwartungsgemäß nur transiente Expression,

aber auf niedrigem Level. Solche für Polyoma Virus hoch permissive Zellkulturen sollten theoretisch hohe Expressionsraten zeigen, ohne transformiert zu werden. Eine Aussage über die Expressivität dieser Zellen ist nicht möglich, da die transiente Expression einer Zellkultur wesentlich von der Zahl der Zellen abhängt, die Fremd-DNA aufgenommen haben. Dies ist aber eine Funktion der Effizienz der Transfektion, die mit der Kalziumphosphat-Technik nicht zu standardisieren ist. Primärkulturen zeigen im Gegensatz zu den speziell zum Gentransfer gezogenen permanenten Zelllinien (z.B. NIH 3T3 Mausfibroblasten) meist eine niedrige Transfektionssensibilität. Da in den Primärkulturen keine Transformanten gebildet werden, kann auch kein Vergleich über die permanente Expression, wie bei den permanenten Zellen, gezogen werden. Nur die Mikroinjektion, bei der definierte DNA Mengen in definierte Zellzahlen injiziert werden können, böten eine Vergleichsmöglichkeit der transienten Expression. Zur Zeit der Versuche war diese Technik im Labor noch nicht verfügbar. Die durchgeführten Experimente zeigen jedoch klar, daß die Expression des HBsAg unter dem Polyoma Virus Vektor in primären Mauszellen möglich ist und die Limitierung im Bereich des Gentransfers liegen muß. Auch der Vektor mit dem 1350 bp HBV Fragment zeigte in primären Mauszellkulturen transiente Expression, ein weiterer Hinweis für die Effizienz der Expression, aber auch für die Limitierung durch die Transfektion.

Auf Grund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß der Gentransfer auch der limitierende Faktor bei der beabsichtigten in vivo Expression des HBsAg mit dem Polyoma Virus Vektor sein würde. Als Transfermethoden kämen zur Zeit nur zwei Methoden in Frage. Entweder die Verpackung der DNA in ein Viruscapsid mit der Virus-Helfervirus Technik, oder die Verpackung in Liposomen, das heißt künstliche, einfach herzustellende Phospholipidvesikel als "Zellmembranen". Beide Methoden sollen die DNA vor Abbau schützen und durch direkten Zellkontakt in die Zellen einschleusen. Die Verpackung in Viruscapsid ist im Prinzip mit guten Ergebnissen in vitro verwirklicht (29, 46, 51, 77), aber noch nicht in vivo angewendet worden. Gen-

transfer mit Liposomen ist in vitro ebenfalls gut etabliert (35,81,90,108), aber in vivo noch nicht gelungen. Mit dem HBsAg als Markergen würde die Erfolgskontrolle durch einfache Antikörpermessung gegen HBsAg im Serum der Maus - das adäquate Tiermodell - erheblich erleichtert und die Organpräferenz (Leber) bei in vivo Anwendung der Liposomen würde eher ein Vorteil als ein Nachteil sein. Prinzipiell wäre, vorausgesetzt der Gentransfer könnte effizient gestaltet werden, eine Impfung mit DNA denkbar. Ein Gen, das für das immunogene Antigen, z.B. HBsAg, codiert, könnte mit einem Expressionsvektor gekoppelt werden, der nicht in die DNA integriert (Tumorigenität) und nur im Zytoplasma in hoher Effizienz repliziert und exprimiert wird. Kurzfristige transiente Expression des Antigens in hoher Effizienz könnte - evt. bei mehrfacher Wiederholung - genügen, eine Antikörperreaktion auszulösen und einen Impfschutz aufzubauen. Durch Abbau der DNA im Zytoplasma der Zelle oder durch Zelluntergang nach Antikörperbelegung - letzteres ein Mechanismus, der auch bei Vaccinierung mit Lebendimpfstoff stattfindet - sind Bedenken hinsichtlich Infektiösität oder Tumorigenität von DNA-Impfungen unbegründet.

Auch eine Gentherapie wäre über einen ähnlichen Weg denkbar, wobei hinsichtlich Expressionsvektor (permanente statt transiente Expression) und Genregulation (Anpassung an Bedarf) qualitativ andere Erfordernisse im Vordergrund stünden. Diese in vivo Experimente sind daher Vorläufer- oder Modellexperimente für eine momentan nur theoretisch denkbare Gentherapie zu verstehen, deren drei wichtigsten Probleme, erstens der Gentransfer in vivo, zweitens der passende Vektor und drittens die Genregulation praktisch noch nicht gelöst sind.

5. Zusammenfassung

Das Hepatitis B Virus wird als Verursacher der B-Hepatitis und nach neueren epidemiologischen Untersuchungen auch für die Auslösung des primären Leberkarzinoms verantwortlich gemacht. Die Prävalenz des primären Leberkarzinoms korreliert eng mit dem Lebenserwartungsgrad der Bevölkerung zur HBsAg. Die Einführung eines Hepatitis B Virus Impfstoffes ist deshalb von großer medizinischer Bedeutung. Die Unmöglichkeit, das Virus in vitro zu züchten, führte einerseits zur Entwicklung eines Impfstoffes aus dem Serum von HBV infizierten Menschen mit allen damit zusammenhängenden Nachteilen (Gefahr der Infektiosität, hohe Kosten), andererseits zu intensiven Bemühungen, mit gentechnologischen Methoden einen Impfstoff herzustellen.

Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit war die gentechnologische Herstellung des immunogenen Oberflächenantigens HBsAg des HBV in Zellkulturen. Dabei diente die Polyoma Virus DNA als Expressionsvektor.

Zwei verschieden große DNA-Fragmente, die beide kodierende Sequenzen für das HBsAg enthalten, wurden mit Restriktionsenzymen der HBV DNA entnommen und in die DNA des Polyoma Virus eingesetzt. Das größere Fragment mit 2770 bp Länge wurde mit dem RE BglII, das kleinere Fragment mit 1250 bp Länge wurde mit dem RE BamHI aus der HBV DNA excidiert. Das 1350 bp Fragment enthält, im Gegensatz zum 2770 bp Fragment, nur die kodierenden Sequenzen für das HBsAg Gen. Es fehlen die eigenen Promotoren und die Pre-S Sequenzen. Der Integrationsort dieser HBV Fragmente in der Polyoma Virus DNA ist die BclI RE Schnittstelle hinter den Promotor, welcher nur die späten Polyoma Proteine (Capsidproteine). Die frühen oder T-Protein Sequenzen der Polyoma DNA blieben dabei unverändert und dienten auf diese Weise als Selektionsmarker für solche Zellen, die eingeschleuste Fremd-DNA aufgenommen hatten und Polyoma Virus Gene mit angekoppeltem HBsAg exprimierten.

Durch Insertion der rekombinierten DNA (HBV + Polyoma Virus

in das bakterielle Plasmid BR322 entstanden die Plasmide PHBsII17 (2770 bp HBV DNA Fragment) und PHBs1350/24 (1350 bp HBV DNA Fragment). Die Plasmide wurden in Bakterien kloniert und in Bakterienmassenkulturen vermehrt, um genügend identische DNA für die Transfektionsexperimente zu erhalten. Mit Hilfe der Calciumphosphat-Technik wurde Plasmid DNA in Maus- und Rattenfibroblasten eingeschleust.

Das Plasmid PHBsII17 ergab in NIH 3T3 Mausfibroblasten (Klon A2) HBsAg Expressionsraten, die zweimal so hoch lagen wie die als Vergleich dienenden Expressionsraten der humanen Lebertumorzelllinie PHL/PLC/5 Alexander. Das gleiche Plasmid erreichte in Fisher Rat 1 Fibroblasten nur ein Drittel der Expressionsrate des Mausfibroblastenklons A2. Das PHBs1350/24 (1350 bp Fragment der HBV DNA) lag mit seiner Expressionsrate in Fisher Rat 1 Fibroblasten um ein Drittel unter der Expressionsrate des Plasmids PHBsII17 in der gleichen Zelllinie. In Maus 3T3 Fibroblasten konnten nach Transfektion des Plasmids PHBs1350/24 keine HBsAg exprimierenden Klone isoliert werden. Die genannten Expressionsraten wurden von permanent HBsAg exprimierenden Zellklonen erbracht, die aus Polyoma Virus Vektor transformierten Zellen nach Softagarselektion entstanden waren.

In primären Mauszellkulturen, aus Mausedembryonen gewonnen, wurden mit beiden Plasmiden niedrige, aber eindeutig positive HBsAg Werte aus transienter Expression gemessen.

Daneben wurden Transfektionsexperimente mit dem Plasmid HBT119 durchgeführt, das aus zwei kompletten HBV DNA Molekülen in Kopf-zu-Schwanz Tandemformation und dem bakteriellen Plasmid BR322 konstruiert wurde. Transfiziert in NIH 3T3 Mausfibroblasten, zeigte das Plasmid im Vergleich zum Plasmid PHBsII17 nur eine transiente Expressionsrate, die aber, langsam abfallend, über 3 Monate anhielt. Die transiente Expression des Plasmids PHBsII17 hielt dagegen nur wenige Tage an, um nach einem Monat als Resultat der Expression von vektortransformierten Zellen erneut anzusteigen. Als Ursache der langdauernden transienten Expression des Plasmids HBT119 kann eine hohe Integrationsfähig-

keit der HBV DNA angenommen werden. Durch Vorinkubation der Zellkulturen mit sog. Tumorpromotoren (TPA, Griseofulvin) und anschließende Transfektion des Plasmid HBT119 wurde versucht, die Integrationsrate der HBV DNA ins Wirtszellgenom zu erhöhen und eventuell eine maligne Transformation auszulösen. Die Ergebnisse lassen jedoch keine eindeutige Wertung zu.

Mit der Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Expression des HBsAg in vitro mit der Polyoma Virus DNA als Vektor 2-fach höhere Werte ergibt als die Expression in humanen sogenannten Alexander Lebertumorzellen. Entscheidend für die Höhe der Expressionsrate ist zum einen die Konstruktion der DNA (Integrität des HBsAg Gens im Plasmid PHBsII17), zum anderen die Art der Wirtszellen (Permissivität) in Abhängigkeit zum verwendeten Vektor (Polyoma Virus DNA).

Die transiente Expression von HBsAg in primären Mauszellkulturen zeigt, daß die Polyoma Virus DNA als Expressionsvektor für permissive Mauszellen geeignet ist. Mit der hierfür verwendeten DNA Konstruktion könnte auch HBsAg Expression bei der in vivo Anwendung möglich sein.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Aaij C., Borst P., *Biochim. Biophys. Acta* 296 (1972) 192-200. The gel electrophoresis of DNA.
- 2 Abelson J. *Ann. Rev. Biochem.* 48 (1979) 1035-1069). RNA processing and intervening sequence problem.
- 3 Almeida J.D., Rubenstein D., Stott N.E.J., *Lancet* II (1971) 1225-1227. New antigen-antibody system in Australia antigen positive hepatitis.
- 4 Amtmann E., Sauer G., Activation of non-expressed bovine papilloma virus genomes by tumor promoters. *Nature* 296 (1982) 675-677.
- 5 Avery O., Macloed C., McCarty M., *J. Exp. Med.* 79 (1944) 137-139. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types.
- 6 Banerji J., Rusconi S., Schaffner W., *Cell* 27 (1981) 299-308. Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences.
- 7 Barker L.F., Maynard J.E., Pucell R.H., Hoofnagle J.H., Berquist K.R., London W.T., *Am. J. Med. Sci.* 270 (1975) 189-195. Viral hepatitis, type B, in experimental animals.
- 8 Basilico C., Gattoni S., Zonzias D., DellaValle G., *Cell* 17 (1979) 645-659. Loss of integrated viral DNA sequences in polyoma transformed cells is associated with an active viral A function.
- 9 Benoist C., Chambon P., *Nature* 290 (1981) 304-310. In vivo sequence requirements of early SV40 promoter region.
- 10 Benoist C., O'Harre K., Breathnach R., Chambon P., *Nucl. Acids Res.* 8 (1980) 127-142. The ovalbumin gene-sequence of putative control regions.
- 11 Bertani G., Weigle J.J., *J. Bacteriol.* 65 (1953) 113-121 Host controlled variation in bacterial viruses.
- 12 Breathnach R., Benoist C., O'Harre K., Gannon F., Chambon P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4853-4857. Ovalbumin gene: Evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries.
- 13 Brechot C., Pourcel C., Louise A., Rain B., Ticllais F., *Nature* 286 (1980) 533-535. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepato-cellular carcinoma.

- 14 Burrell C.J., MacKay P., Grenaway P.J., Hofschneider P.H., Murray K., Nature 279 (1979) 43-47. Expression in *Escherichia Coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322.
- 15 Beasley P.R., Lin C.C., Hwang L.Y., Chien C.S., The Lancet II (1981) 1129-1133. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus.
- 16 Bolivar F., Rodriguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L., Boyer H.W., Gene 2 (1977) 95-113. Construction and characterization of new cloning vehicles. II A multipurpose cloning system.
- 17 Chakraborty P.R., Ruiz-Opazo N., Shouval D., Shafritz D. A., Nature 268 (1980) 531-533. Identification of integrated hepatitis B virus DNA and expression of viral RNA in an HBsAg-producing human hepatocellular carcinoma cell line.
- 18 Christman J.K., Cerber M., Price P.M., Flordellis C., Edelman J., Acs G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1981) 1815-1819. Amplification of expression of hepatitis B surface antigen in 3T3 cells cotransfected with a dominant-acting gene and cloned viral DNA.
- 19 Clarke L., Carbon J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 4361-4365. Biochemical constructions and selection of hybrid plasmids containing specific segments of the *Escherichia Coli* genome.
- 20 Clewell D.B., Helinski D.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62 (1962) 1159-1166. Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia Coli*: Purification and induced conversion to an open circular DNA form.
- 21 Cohen S.N., Chang A.C.Y., Boyer H.W., Helling R.B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 (1973) 3240-3244. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro.
- 22 Colantuoni V., Dailey L., DellaValle G., Basilico C., J. of Virology 43,2 (1982) 617-628. Requirements for excision and amplification of integrated viral DNA molecules in polyoma virus-transformed cells.
- 23 Colbère-Garapin F., Horodniceanu F., Courilsky A.C., Garpin A.C., J. Mol. Biol. 150 (1980) 1-14. A new dominant hybrid selective marker for higher eucaryotic cells.
- 24 Colman A., Byers M.J., Primrose S.B., Lyons A., Eur. J. Biochem. 91 (1978) 303-310. Rapid purification of plasmid DNAs by hydroxyapatite chromatography.
- 25 Cooper G.M., Okenquist S., Silverman L., Nature 284 (1980)

418-421. Transforming activity of DNA of chemically transformed and normal cells.

- 26 Cummings J.W., Browne J.K., Salser W.A., Tyler G.V., Snyder R.L., Smolec J.M., Summers J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 1842-1846. Isolation, characterization, and comparison of recombinant DNAs derived from genomes of human hepatitis B virus and woodchuck hepatitis virus.
- 27 Dane D.S., Cameron C.H., Briggs M., Lancet I (1970) 695-698. Virus-like particles in serum of patients with australia-antigen-associated hepatitis.
- 28 DellaValle G., Fenton R.G., Basilico C., Cell 23 (1981) 347-355. Polyoma large T antigen regulates the integration of viral DNA sequences into the genome of transformed cells.
- 29 Dinces N.B., Milman G., J. of Virol. 42 (1981) 691-699. Encapsidation and expression of the herpes thymidine kinase gene in polyoma virus.
- 30 Doehmer J., Barinaga M., Vale w., Rosenfeld M.G., Verma I.M., Evans R.M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 2268-2272. Introduction of rat growth hormone gene into mouse fibroblasts via a retroviral DNA vector: Expression and regulation.
- 31 Dubois M-F., Pourcel C., Rousset S., Chany C., Tiollais P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77,8 (1980) 4549-4553. Excretion of hepatitis B surface antigen particles from mouse cells transformed with cloned viral DNA.
- 32 Dugaiczky A., Boyer H.W., Goodman H.M., J. Mol. Biol. 96 (1975) 171-184. Ligation of Eco RI endonuclease generated DNA fragments into linear and circular structures.
- 33 Edmann J.C., Gray P., Valenzuela P., Rall L.B., Rutter W. J., Nature 286 (1980) 535-538. Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell.
- 34 Fenton R.G., Basilico C., J. of Virol. 40,1 (1981) 150-163. Viral gene expression in polyoma virus-transformed rat cells and their cured revertants.
- 35 Fraley R., Subramani S., Berg P., Papahadjopoulos D., The Journal of Biological Chemistry 255,21 (1980) 10431-10435. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells.
- 36 Fried M., Klein B., Murray K., Greenaway P., Tooze P., Weissman C., Nature 297 (1979) 811-816. Infectivity in mouse fibroblasts of polyoma DNA integrated into plasmid pBR322 or lambdoid phage DNA.

- 37 Ganem D., Nussbaum A.L., Davoli D., Fareed G.C., Cell 7 (1976) 349-359. Propagation of a segment of bacteriophage λ -DNA in monkey cells after covalent linkage to a defective simian virus 40 genome.
- 38 Gerlich W.H., Robinson W.S., Cell 21 (1980) 801-809. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand.
- 39 Gething M.J., Sambrook J., Nature 293 (1981) 620-625. Cell-surface expression of influenza haemagglutinin from a cloned DNA copy of a RNA gene.
- 40 Goff S.P., Berg P., Cell 9 (1976) 695-705. Construction of hybrid viruses containing SV40 and λ -phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells.
- 41 Gosh P.K., Lebowitz P., Frisque R.J., Gluzman Y., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 100-104. Identification of a promotor component involved in positioning the 5' termini of simian virus 40 early mRNAs.
- 42 Gough N.M., Murray K., J. Mol. Biol. 162 (1982) 43-67. Expression of the hepatitis B virus surface, core and E antigen genes by stable rat and mouse cell lines.
- 43 Griffin B.E., Fried M., Cowie A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974) 2077-2081. Polyoma DNA: A physical map.
- 44 Gruss P., Dhar R., Khoury G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981). Simian virus 40 tandem repeated sequences as an element of early promoter.
- 45 Gruss P., Ellis R.W., Shih T.Y., Konig M., Scolnick E.M., Khoury G., Nature 293 (1981) 486-488. SV40 recombinant molecules express the gene encoding p21 transforming protein of Harvey murine sarcoma virus.
- 46 Gruss P., Khoury G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 133-137. Expression of simian 40 rat preproinsulin recombinants in monkey kidney cells: Use of preproinsulin RNA processing signals.
- 47 Gruss P., Khury G., Current Topics in Microbiology and Immunology. Use of viral vectors to investigate regulatory signals for expression of eucaryotic genes.
- 48 Gutai M.W., Nathans D.J., J. Mol. Biol. 126 (1978) 259-274. Evolutionary variants of simian virus 40. Nucleotide sequence of a conserved SV40 DNA segment containing the origin of viral DNA replication as an inverted repetition.
- 49 Hamer D.H., Davoli D., Thomas C.A.J., Fareed G.C., J.Mol.

- Biol. 112 (1977) 155-182. Simian virus 40 carrying an Escherichia Coli suppressor gene.
- 50 Hamer D.H., Leder P., Cell 17 (1979) 737-747. SV40 recombinants carrying a functional RNA splice junction and polyadenylation site from the chromosomal mouse β -maj globin gene.
 - 51 Hamer D.H., Leder P., Nature 281 (1979) 35-40. Expression of the chromosomal mouse β -maj globin gene cloned in SV40.
 - 52 Hamer D.H., Smith K.D., Boyer S.H., Leder P., Cell 17 (1979) 725-735. SV40 recombinants carrying rabbit β -globin gene coding sequences.
 - 53 Hedgpeth J., Goodman H.M., Boyer H.W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972) 3448-3452. DNA nucleotide sequence restricted by the R1 endonuclease.
 - 54 Hofschneider P.H., Marquardt O., Wong T.K., Zaslavsky V., Viruses in naturally occurring cancers., Essex, Todaro, zur Hausen (1980) 435-446. Structures specific for hepatitis B virus in cytoplasmic extracts of a hepatoma cell line producing hepatitis B surface antigen.
 - 55 Horowicz D.I., Burke J.F., Nucl. Acids Res. 9 (1981) 2989-2998. Rapid and efficient cosmid cloning.
 - 56 Huges S.H., Shank P.R., Spector D.H., Kung H.J., Bishop J.M., Varmus H.E., Vogt P.K., Breitman M.L., Cell 15 (1978) 1397-1410. Proviruses of avian sarcoma virus are terminally redundant, co-extensive with unintegrated linear DNA and integrated at many sites.
 - 57 Inselburg J., Oka A., J. Bacteriology 123 (1975) 739-742. Discontinuous replication of colicin E1 plasmid deoxyribonucleic acid.
 - 58 Koshy R., Hofschneider P.H., Barin F., Romet-Lemonne J.L., Goudeau A., Maupas P., Hepatitis B Vaccine, Maupas P., Guesry P., Inserm Symposium No.18 (1981) Elsevier North/Holland Biomed. Press. Presence of hepatitis B DNA sequences integrated in the DNA of hepatocarcinoma and cirrhosis tissues.
 - 59 Landers T.A., Greenberg H.B., Robinson W.S., J. Virol. 23 (1977) 368-376. Structure of the hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction.
 - 60 Law M.F., Lowy D.R., Dvoretzky J., Howley P.M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 2727-2731. Mouse cells transformed by bovine papilloma virus contain only extrachromosomal viral DNA sequences.

- 61 Legon S., Flavell A.J., Cowie A., Kamen R. Cell 16 (1979) 373-388. Amplification in the leader sequence of late polyoma virus mRNAs.
- 62 Loenen L., Brammar W.J. Gene 10 (1980) 249-259. A bacteriophage lambda vector for cloning large DNA fragments made with several restriction enzymes.
- 63 Lowy I., Pellicer A., Jackson J.F., Sim G.K., Silverstein S., Axel R. Cell 22 (1980) 817-823. Isolation of transforming DNA: Cloning the hamster aprt gene.
- 64 Luria S.E., Human M.L. J. Bacteriology 64 (1952) 557-569. A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses.
- 65 Lutwick L.B., Robinson W.S. J. Virol. 21 (1977) 96 ff. DNA synthesized in the hepatitis B Dane particle DNA polymerase reaction.
- 66 MacKay P., Lees J., Murray K. J. Med. Virol. 8 (1981) 237-243. The conversion of Hepatitis B Core Antigen synthesized in E. coli into E Antigen.
- 67 MacPherson I., Montagnier L.M. Virology 23 (1964) 291 ff. Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus.
- 68 Mandel N., Higa A.J. Molec. Biol. 53 (1970) 159-162. Calcium dependent bacteriophage DNA infection.
- 69 Mantei N., Boll W., Weissmann C. Nature 281 (1979) 40-46 Rabbit B-globin mRNA production in mouse L cells transformed with cloned rabbit B-globin chromosomal DNA.
- 70 Marion P.L., Salazar F.H., Alexander J.J., Robinson W.S. J. Virol. 33 (1980) 795-806. State of hepatitis B vial DNA in a human hepatoma cell line.
- 71 Mason W.S., Aldrich C., Summers J., Taylor J.M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 3997-4001. Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells (free minusstrand DNA).
- 72 Mason W.S., Seal G., Summers J. Journal of Virology 36,3 (1980) 829-836. Virus of pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus.
- 73 Mathis D.J., Chambon P. Nature 290 (1981) 310-315. The SV40 early region TATA box is required for accurate in vitro initiation of transcription.
- 74 Maupas P., Guesry P. Hepatitis B vaccine. Inserm symposium 18, elsevier/North-Holland.

- 75 Mertz J.F., Davis R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972) 3370-3374. Cleavage of DNA by RI restriction endonuclease generates cohesive ends.
- 76 Miyahara A., Toh-e A., Nozaki C., Hamada F., Ohtomo N., Matsubara K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 1-5. Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast.
- 77 Moriarty A.M., Hoyer B.H., Shih J.W.-K., Gerin J.L., Hamer D.H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78,4 (1981) 2606-2610. Expression of the hepatitis B virus surface antigen gene in cell culture by using a simian virus 40 vector.
- 78 Morrow J.F., Berg P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972) 3365-3369. Cleavage of simian virus 40 DNA at a unique site by a bacterial restriction enzyme.
- 79 Morrow J.F., Cohen S.N., Chang A.C.Y., Boyers H.W., Goodman H.M., Helling R.B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974) 1743-1747. Replication and transcription of eucaryotic DNA in *E. coli*.
- 80 Morse M., Lederberg E., Lederberg J. Genetics 41 (1956) 142-156. Transduction in *Escherichia coli* K12.
- 81 Mukherjee A.B., Orloff S., Butler S.D., Triche T., Lalley P., Schulman J.D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75,3 (1978) 1361-1365. Entrapment of metaphase chromosomes into phospholipid vesicles (lipochromosomes): Carrier potential in gene transfer.
- 82 Mulligan R.C., Howard H., Berg P. Nature 277 (1979) 108-114. Synthesis of rabbit β -globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 β -globin recombinant genome.
- 83 Murray N.E., Brammar W.J., Murray K. Molec. gen. Genet. 150 (1977) 53-61. Lambdaoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants.
- 84 Murray K., MacKay P., Burrell C.J., Schaller H., Stahl S., Pasek M. Hepatitis B vaccine. In: In: Symposium No. 18 (1981) 289-304 Maupas P., Guesry P. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. The expression of hepatitis B virus antigen genes in *Escherichia coli*.
- 85 Murray N.E., Murray K. Nature 251 (1974) 476-481. Manipulation of restriction targets in phage λ to form receptor chromosomes for DNA fragments.
- 86 Nature 235 (1972) 130-131. Hepatitis infection in hospitals.
- 87 Neel B.G., Hayward W.S., Cell 23 (1981) 323-334. Avian Leukosis virus induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: Oncogenesis by promoter insertion.

- 88 O'Hare K., Benoist C., Breathnach R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 1527-1531. Transformation of mouse fibroblasts to methotrexate resistance by a plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase.
- 89 Ogston C.W., Jonak G.J., Rogler C.E., Astrin S.M., Summers J. Cell 29 (1982) 385-394. Cloning and structural analysis of integrated woodchuck hepatitis virus sequences from hepatocellular carcinomas of woodchucks.
- 90 Ostro M.J., Giacomoni D., Lavelle D., Paxton W., Dray S. Nature 274 (1978) 921-923. Evidence for translation of rabbit globin mRNA after liposome-mediated insertion into a human cell line.
- 91 Padmanabhan R., Wu R. J. Mol. Biol. 65 (1972) 447-464. Nucleotide sequence analysis of DNA. Complete nucleotide sequence of the left-hand cohesive end of coliphage 186 DNA.
- 92 Panicali D., Paoletti E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 4927-4931. Construction of poxviruses as cloning vectors: Insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus.
- 93 Paul J. Zell- und Gewebekultur (1979) W. de Gruyter
- 94 Pellicer A., Wigler M., Axel R. Cell 14 (1978) 133-144. The transfer and stable integration of the thymidine kinase gene into mouse cells.
- 95 Pourcel C., Louise A., Gervais M., Chenciner N., Dubois M.F., Tiollais P. Journal of Virology 42,1 (1982) 100-105. Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in mouse cells transformed with cloned viral DNA.
- 96 Prince A.M., Ikram H., Hopp T.P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 579-582. Hepatitis B virus vaccine: Identification of HBsAg/a, HBsAg/d but not HBsAg/y subtype antigenic determinants on a synthetic immunogenic peptide.
- 97 Proudfoot N.J., Brownlee G.G. Nature 252 (1974) 359-362. Sequence at the 3' end of globin mRNA shows homology with immunoglobulin light chain mRNA.
- 98 Radloff R., Baeur W., Vinograd J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57 (1967) 1514-1522. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular DNA: The closed circular DNA in HeLa cells.
- 99 Rambach A., Tiollais P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974) 3927-3930. Bacteriophage λ having Eco RI endo-

nuclease sites only in the nonessential region of the genome.

- 100 Rassoulzadegan M., Cowie A., Carr A., Glaichenhaus N., Kamen R., Cuzin F. *Nature* 300 (1982) 713-718. The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation.
- 101 Rechavi G., Girol D., Canaani E. *Nature* 300 (1982) 607-610. Activation of a cellular oncogene by DNA rearrangement: Possible involvement of an IS-like element.
- 102 Robinson W.S. *Ann. Rev. Microbiol.* 31 (1977) 357-377. The genome of the hepatitis B virus.
- 103 Robinson W.S., Clayton D.A., Greenman R.L. *J. Virol.* 14 (1974) 384-391. DNA of a human hepatitis B virus candidate.
- 104 Sabran J.L., Hsu T.W., Yeater C., Kaji A., Mason W.S., Taylor J.M. *J. Virol.* 29 (1979) 170-178. Analysis of integrated avian RNA tumor virus DNA in transformed chick, duck and quail fibroblasts.
- 105 Sarver N., Gruss P., Law M.F., Khoury G., Howley P.M. *Mol. Cell. Biol.* 1 (1981) 486-496. Bovine papilloma virus deoxyribonucleic acid: A novel eucaryotic cloning vector.
- 106 Sattler F., Robinson W.S. *J. Virol.* 32 (1979) 226-233. Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends.
- 107 Saunders R.M., Alexander J. *Lancet* 2 (1977) 713. Electron microscopy of HBsAg from human hepatoma cell line.
- 108 Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H. *Science* 215 (1982) 166-168. Liposomes as gene carriers: Efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase gene.
- 109 Seif I., Khoury G., Dhar R. *Nucleic Acids Res* 6 (1979) 3387-3398. BKV splice sequences based on analysis of preferred donor and acceptor sites.
- 110 Seif R. *J. Virol.* 36,2 (1980) 421-428. Factors which disorganize microtubules or microfilaments increase the frequency of cell transformation by polyoma virus.
- 111 Shafritz D.A., Kew M. *Hepatology* 1 (1981) 1-8. Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinomas.
- 112 Sharp P.A., Sudgen B., Sambrook J. *Biochemistry* 12 (1973) 3055-3063. Detection of two restriction endonuclease activities in *H. parainfluenzae* using analytical agarose-ethidiumbromide electrophoresis.

- 113 Shimotohno K., Temin H.M. Cell 26 (1981) 67-77. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus.
- 114 Siddiqui A., Marion P.L., Robinson W.S. J. Virol. 38,1 (1981) 393-397. Ground squirrel hepatitis virus DNA: Molekular cloning and comparison with hepatitis B virus DNA.
- 115 Siddiqui A., Sattler F., Robinson W.S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4664-4668. Restriction endonuclease cleavage map and location of unique features of the DNA of hepatitis B virus, subtype adw₂.
- 116 Smith G.L., Mackett M., Moss B. Nature 302 (1983) 490-495. Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen.
- 117 Sninsky J.J., Siddiqui A., Robinson W.S., Cohen S.N. Nature 279 (1979) 236-248. Cloning and endonuclease mapping of the hepatitis B virale genome.
- 118 Soeda E., Arrand J.R., Smolar N., Walsh J.E., Griffin B.E. Nature 283 (1980) 445-453. Coding potential and regulatory signals of the polyoma genome.
- 119 Stahl S., MacKay P., Magazin M., Bruce S.A., Murray K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 1606-1610. Hepatitis core antigen: Synthesis in Escherichia coli and application in diagnosis.
- 120 Stevens C.E., Beasley P., Tsui J., Lee W.-C. New Engl. J. Med. 292 (1975) 771 ff. Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan.
- 121 Stratowa C., Doehmer J., Wang Y., Hofschneider P.H. The EMBO Journal 1,12 (1982) 1573-1578. Recombinant retroviral DNA yielding high expression of hepatitis B surface antigen.
- 122 Subramanian K.N., Shenk T. Nucl. Acids Res. 5 (1978) 3635-3642. Definition of the boundaris of the origin of DNA replication in simian virus 40.
- 123 Summers J. Hepatology 1 (1981) 179-183. Tree recently described animal virus models for human hepatitis B virus.
- 124 Summers J., Mason W.S. Cell 29 (1982) 403-415. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of a RNA intermediate.
- 125 Summers J., O'Connell A., Millman I. Proc. Natl. Acad. Sci USA 72 (1975) 4597-4601. Genome of hepatitis B virus: Restriction enzyme cleavage and structure of the DNA isolated from Dane particles.

- 126 Summers J., Smolec J.M., Snyder R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 4533-4537. A virus similar to hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks.
- 127 Sveda M.M., Lai C.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 5488-5492. Functional expression in primate cells of cloned DNA coding for the haemagglutinin surface glycoprotein of influenza virus.
- 128 Szmunness W. Prog. Med. Virol. 24 (1978) 40. Hepato-cellular carcinoma and hepatitis B virus: Evidence for a causal association.
- 129 Szmunness W., Much M.I., Prince A.M., Hoofnagle I.H., Cherubin C.E., Harley E.J., Block G.H. Ann. Int. Med. 83 (1975) 489. On the role of sexual behavior in the spread of hepatitis B infection.
- 130 Twist E.M., Clark H.F., Aden D.P., Knowles B.P., Plotkin S.A. J. Virol. 37 (1981) 239-243. Integration pattern of hepatitis B virus sequences in human hepatoma cell lines.
- 131 Tooze, DNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory 1980. Molecular biology of tumor viruses, second edition.
- 132 Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischler E., Rutter W.J., Goodman H.M. Science 196 (1977) 1313-1319. Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences.
- 133 Upcroft P., Skolnik H., Upcroft J.A., Solomon D., Khoury G., Hamer D.H., Fareed G.C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 2117-2121. Transduction of a bacterial gene into mammalian cells.
- 134 Valenzuela P., Medina A., Rutter W.J., Ammerer G., Hall B.D. Nature 298 (1982) 347-350. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast.
- 135 Valenzuela P., Gray P., Quiroga M., Zaldivar J., Goodman H.M., Rutter W.J. Nature 280 (1979) 815-819. Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen.
- 136 Villiers J. de, Schaffner W. Nucl. Acids Res. 9 (1981) 6251-6264. A small segment of polyoma virus DNA enhances the expression of a cloned β -globin gene over a distance of 1400 base pairs.
- 137 Wang Y., Schaefer-Ridder M., Stratowa C., Wong T.K., Hofschneider P.H. The EMBO Journal 1,10 (1982) 1213-1216. Expression of the hepatitis B surface antigen in unselected cell culture transfected with circularized HBV DNA.

- 138 Wang Y., Stratowa C., Schaefer-Ridder M., Doehermer J., Hofschneider P.H. Molekular and Cellular Biology 3,6 (1983) 1032-1039. Enhanced production of hepatitis B surface antigen in NIH 3T3 mouse fibroblasts by using extrachromosomally replicating bovine papilloma virus vector.
- 139 Wigler M., Pellicer A., Silverstein S., Axel R. Cell 14 (1978) 725-731. Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor.
- 140 Wigler M., Pellicer A., Silverstein S., Axel R., Urlaub G., Chasin L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 1373-1376. DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus in mammalian cells.
- 141 Wigler M., Perucho M., Kurtz D., Dana S., Pellicer A., Axel R., Silverstein S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 3567-3570. Transformation of mammalian cells with an amplifiable dominant-acting gene (DHFR).
- 142 Wigler M., Silverstein S., Lee L.S., Pellicer A., Cheng Y.C., Axel R. Cell 11 (1977) 223-232. Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells.
- 143 Wilson G.G., Murray N.E. J. Mol. Biol. 132 (1979) 471-491. Molecular cloning of the DNA ligase gene from bacteriophage T4.
- 144 Zuckerman A.J. Virus diseases of the liver (1979) 16-42, Butterworths, London. The history and epidemiology of infectious and serum hepatitis.
- 145 Zuckerman A.J. Human viral hepatitis (1975) 207-224 (2nd ed.) Post-transfusion hepatitis.
- 146 Zuckerman A.J. Nature 287 (1980) 483-484. Towards the conquest of hepatitis B.
- 147 Zuckerman A.J., Howard C.R. Hepatitis viruses of man (1979) 22-34.

7. Verzeichnis der Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
atü	Atmosphärenüberdruck
bidest.	zweifach destilliert
BSA	Rinderserum Albumin
DMEM	Dulbecco's modified Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Dinatriumsalz der Äthylendinitrilotetraessigsäure
et al.	und andere
FCS	foetales Kälberserum
g	Gramm
Hepes	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-Äthansulfonsäure
l	Liter
M	Molar
MG (MW)	Molekulargewicht
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
RE	Restriktionsenzym
RNA	Ribonukleinsäure
sec	Sekunde
Std	Stunde
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

Lebenslauf

Willy Kurt Roth

- 24.01.1950 geboren in Thaleischweiler/Fröschen
- 1956 - 60 Besuch der Volksschule Thaleischweiler
- 1960 - 68 Besuch des Staatlichen, Mathematisch- Natur-
wissenschaftlichen Gymnasiums in Frankenthal/
Pfalz
- ab 1968 Studium der Biologie und Chemie an der Universi-
tät des Saarlandes, Saarbrücken, bis zum Vordiplom
- 1972 - 78 Ausbildung und Beschäftigung als Bundesbahninspek-
tor im gehobenen nichttechnischen Dienst im Bereich
der Bundesbahndirektion München
- WS 1978/79 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU
München
- Aug 1980 Ärztliche Vorprüfung
- Aug 1981 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Sept 1981 Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit am Max-
Planck- Institut für Biochemie in Martinsried bei
München in der Abteilung für Virusforschung bei
Prof. Dr. Dr. P.H. Hofschneider
- Aug 1983 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Okt 1983 Beginn des Praktischen Jahres: Innere Medizin an
der Med. Klinik I, Klinikum Großhadern, Direktor
Prof. Dr. G. Riecker; Chirurgie an der Klinik und
Polyklinik für Chirurgie, Klinikum Großhadern,
Direktor Prof. Dr. G. Heberer; Neurologie an der
Neurologischen Klinik, Klinikum Großhadern,
Direktor Prof. Dr. A. Schrader.
- Okt 1984 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung



